

**Molekularbiologische Charakterisierung
von Resistenzfaktoren aus klinisch isolierten,
multiresistenten Escherichia coli Stämmen**

von
Friedrich Schöffl
aus
Ebermannstadt

1976 № **116**



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546226_0050

Molekularbiologische Charakterisierung von Resistenzfaktoren aus klinisch isolierten, multiresistenten Escherichia coli Stämmen

Den Naturwissenschaftlichen Fachbereichen
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg
zur
Erlangung des Doktorgrades

vorgelegt
von
Friedrich Schöffl
aus
Ebermannstadt

Als Dissertation genehmigt von den Naturwissen-
schaftlichen Fachbereichen der Universität
Erlangen-Nürnberg



Tag der mündlichen Prüfung: 20. 2. 1976

Vorsitzender der Promotionskommission: Prof. Dr. H. Pemmert

Erstberichterstatter:

Prof. Dr. W. Heumann

Zweitberichterstatter:

Prof. Dr. R. Schmitt

Inhalt :	Seite
<u>A. Zusammenfassung</u>	1
<u>B. Einleitung</u>	3
<u>C. Material und Methoden</u>	6
<u>1. Bakterienstämme</u>	6
<u>2. Chemikalien</u>	7
<u>3. Medien u. Puffer</u>	8
<u>4. Bakterienanzucht</u>	9
4.1 Wuchsbedingungen	9
4.2 Messung der optischen Dichte	9
4.3 Ernte der Zellen	9
4.4 Lebendtitrierbestimmung	9
<u>5. Genetische Methoden</u>	10
5.1 R-Faktor-Transfer auf Festmedium	10
5.2 R-Faktor-Transfer im Flüssigmedium	10
5.3 Bestimmung der Transferfrequenz	11
5.4 Transformation von E. coli mit Plasmid-DNA	11
5.5 R-Faktor-Eliminierung	11
<u>6. Radioaktive DNA-Markierung</u>	12
6.1 Markierungsbedingungen für E. coli thy ⁻ (thy ⁺)	12
6.2 Nachweis der Radioaktivität in der DNA	12
<u>7. Zellaufschlußmethoden</u>	13
7.1 Sarkosylverfahren	13
7.2 "Cleared Lysate"-Verfahren	13
<u>8. CsCl-Dichtegradientenzentrifugation</u>	14

8.1	Präparative Ultrazentrifugation zur Plasmid-isolierung	14
8.2	Analytische Ultrazentrifugation zur DNA-Dichtebestimmung	15
9.	<u>DNA-Aufbereitung</u>	16
9.1	EthBr-Extraktion	16
9.2	Dialyse	16
9.3	Konzentrationsbestimmung	16
10.	<u>Elektronenmikroskopie</u>	17
10.1	Präparation von Plasmid-DNA	17
10.2	Längenmessung der Plasmid-DNA	18
11.	<u>Antibiogramme</u>	18
12.	<u>H₂S-Nachweis</u>	19
D.	<u>Ergebnisse</u>	20
1.	<u>Methodik der Plasmidanalyse</u>	20
1.1	Nachweis von Plasmid-DNA	20
1.2	Einfluß der Lysismethode auf den Plasmidanteil	21
1.3	Nachweis von Plasmid-DNA nach R-Faktor-Transfer	27
1.4	Plasmidisolierung ohne radioaktive DNA-Markierung	30
1.5	Isolierung von R. lupini-Referenz-DNA	31
1.6	Dichtebestimmung von R. lupini-Referenz-DNA	33
1.7	Dichtebestimmung der Gesamt-DNA aus E. coli UR323 und -UR12644	35
2.	<u>Charakterisierung des Resistenzfaktors R323</u>	37
2.1	Plasmidanalyse des multiresistenten E. coli Stammes UR323	39

2.1.1	Nachweis und Isolierung von Plasmid-DNA aus UR323	39
2.1.2	Darstellung und Längenmessung der Plasmide aus UR323	39
2.1.3	Dichtebestimmung der Plasmid-DNA aus UR323	44
2.2	Analyse des R323-Faktors in E. coli NC22	44
2.2.1	Transfer der Resistenzgene von UR323 nach NC22	44
2.2.2	Nachweis und Isolierung von Plasmid-DNA aus NC22 (R323)	48
2.2.3	Darstellung und Längenmessung der Plasmide aus NC22 (R323)	48
2.2.4	Dichtebestimmung der Plasmid-DNA aus NC22 (R323)	49
2.2.5	Interpretation der Ergebnisse	50
3.	<u>Charakterisierung des Resistenzfaktors R12644</u>	51
3.1	Plasmidanalyse des multiresistenten E. coli Stammes UR12644	52
3.1.1	Nachweis und Isolierung von Plasmid-DNA aus UR12644	52
3.1.2	Darstellung und Längenmessung der Plasmide aus UR12644	52
3.1.3	Dichtebestimmung der Plasmid-DNA aus UR12644	53
3.2	Analyse des R12644-Faktors in E. coli NC22	57
3.2.1	Transfer der Resistenzgene von UR12644 nach NC22	57
3.2.2	Nachweis und Isolierung von Plasmid-DNA aus NC22 (R12644)	63

3.2.3	Darstellung und Längenmessung der Plasmide aus NC22 (R12644)	63
3.2.4	Dichtemessung der Plasmid-DNA aus NC22 (R12644)	66
3.2.5	Arbeitshypothese	67
<u>3.3</u>	<u>Analyse des R12644-2-Faktors</u>	69
3.3.1	Nachweis und Isolierung von Plasmid-DNA aus UR12644-2	69
3.3.2	Darstellung und Längenmessung der Plasmide aus UR12644-2	69
3.3.3	Dichtebestimmung der Plasmid-DNA aus UR 12644-2	74
3.3.4	Transfer der Resistenzgene von UR12644-2 nach NC22	74
3.3.5	Transformation von E. coli MR101 mit Plasmid-DNA aus UR12644-2	76
3.3.6	Nachweis und Isolierung von Plasmid-DNA aus NC22 (R12644-2)	77
3.3.7	Darstellung und Längenmessung der Plasmide aus NC22 (R12644-2)	77
3.3.8	Dichtebestimmung der Plasmid-DNA aus NC22 (R12644-2)	78
<u>3.4</u>	<u>Analyse des R12644-1-Faktors</u>	79
3.4.1	Nachweis und Isolierung von Plasmid-DNA aus NC22 (R12644-1)	79
3.4.2	Darstellung und Längenmessung der Plasmide aus NC22 (R12644-1)	79
3.4.3	Dichtebestimmung der Plasmid-DNA aus NC22 (R12644-1)	84

3.4.4	Transfer der Resistenzgene von NC22(R12644-1) nach E. coli K12-1	85
3.4.5	Transformation von E. coli MB101 mit Plasmid- DNA aus NC22(R12644-1)	87
3.4.6	Nachweis und Isolierung von Plasmid-DNA aus MB101(R12644-1)	88
3.4.7	Darstellung und Längenmessung der Plasmide aus MB101(R12644-1)	88
3.4.8	Dichtebestimmung der Plasmide aus MB101(R12644-1)	89
3.4.9	Interpretation der Ergebnisse	90
E.	<u>Diskussion</u>	93
1.	<u>Methodik der Plasmidanalyse: Ein vereinfachtes Verfahren zur Plasmidisolierung</u>	93
2.	<u>Der Resistenzfaktor R323 - ein stabil kointe- griertes Plasmid</u>	94
3.	<u>Der Resistenzfaktor R12644 - ein instabil ko- integriertes Plasmid</u>	97
4.	<u>R12644-2: Nachweis einer verkürzten Resistenz- determinante</u>	100
5.	<u>R12644-1: Nachweis eines Plasmid-Aggregats mit einer isoliert auftretenden Resistenz- transfereinheit</u>	103
6.	<u>Die Verwandtschaft von R323 und R12644</u>	106
F.	<u>Literatur</u>	108

A: Zusammenfassung

Zwei multiresistente *Escherichia coli* Stämme, UR323 und UR12644, die ein übereinstimmendes Resistenzspektrum von 11 transferierbaren Antibiotikaresistenzen zeigen, wurden einer Plasmidanalyse unterworfen. Eine Zuordnung von Resistenztransfer- und Resistenzgenen zu molekularbiologisch charakterisierten Plasmidspezies gelang nach Anwendung mehrerer genetischer Methoden, wie Konjugation, Transformation und Plasmidelimination. Die molekulare Charakterisierung der einzelnen Plasmidspezies erfolgte durch elektronenmikroskopische Längenmessung und Dichtebestimmung mittels analytischer Ultrazentrifuge.

In dem Stamm UR323 wurde ein transferierbarer Resistenzfaktor, R323, von 33.6 μm gefunden, der der stabil kointegrierten R-Faktorklasse zuzuordnen ist. Zusätzlich vorkommende Mini-Plasmide der Länge 1.2 μm erwiesen sich als nichttransmissibel. Durch die Plasmidanalyse von UR12644 wurde ein infektiöser Resistenzfaktor, R12644, vom instabil kointegrierten Typ nachgewiesen, der aus einem 9.1 μm langen Resistenztransferfaktor (RTF) und einer 31.5 μm langen Multiresistenzdeterminante zusammengesetzt ist. Zwei kleine Plasmide mit 1.8 μm und 2.8 μm Länge, die der Ausgangsstamm ebenfalls beherbergt, sind nichttransmissibel.

Von R12644 existieren 2 Derivate, deren Resistenzdeterminanten um jeweils 8 Resistenzen verkürzt sind. Die Resistenzdeterminante von R12644-1 ist ein Plasmid von 4.2 μm Länge, das nur

noch Resistenz gegen Ampicillin, Carbenicillin und Cephalothin vermitteln kann. Die R12644-2-Resistenzen gegen Streptomycin, Tetracyclin und Tripelsulfonamide werden von einem 6.2 μ m langen Plasmid kodiert. R12644-1 und R12644-2 stellen Plasmid-Aggregate dar, die jeweils aus dem Resistenztransferfaktor (9.1 μ m) und den entsprechenden Resistenzdeterminanten bestehen. Die Entstehung dieser Derivate und die Funktion der Resistenz-transfereinheit werden anhand von Modellen diskutiert.

B: Einleitung

Die Untersuchungen zur extrachromosomal kodierten, bakteriellen Antibiotikaresistenz sind unter zwei verschiedenen Gesichtspunkten zu sehen. Erstens stellen die Resistenzfaktoren ein ernsthaftes medizinisches Problem dar, was meistens in unmittelbarem Zusammenhang mit ihrer Entdeckung steht (45). Zweitens sind diese Plasmide durch ihre genetischen und molekularbiologischen Eigenschaften zu einem wichtigen Hilfsmittel der molekularen Genetik geworden, wobei sie als Träger bzw. Vektoren für Fremdgene verwendet werden (15, 24).

Die beiden multiresistenter *E. coli*-Stämme UP323 und UP12644 wurden von Traub (1975) mikrobiologisch charakterisiert. Beide Stämme zeigen trotz ihrer unabhängig erfolgten klinischen Isolierung identische Resistenzspektren. Diese Resistenzen gegen Ampicillin, Carbenicillin, Cephalothin, Chloramphenicol, Gentamicin, Kanamycin, Neomycin, Streptomycin, Tetracyclin, Tobramycin und Tripel-Sulfonamide sind transmissibel. Als weitere Charakteristika zeigen beide Isolate die Fähigkeit zur H_2S - und Hämolyseproduktion.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die molekulare Struktur und die Funktion der Resistenzfaktoren von UP323 und UR12644 zu analysieren. Die Untersuchungen zur Struktur basieren auf dem Nachweis und der Isolierung von Plasmid-DNA in der ccc-Form ("circular, covalently closed"), wozu als Standardmethode die CsCl-EthBr-Dichtegradientenzentrifugation angewandt wird (33, 4).

Die eigentliche physikalische Charakterisierung der entsprechenden Plasmid-DNA, z. B. Molekulargewichtsbestimmung und Ermittlung des GC-Basenanteils, erfordert zusätzliche Hilfsmessungen. Das Molekulargewicht kann aus den Sedimentationskoeffizienten der Moleküle berechnet werden (21, 39) oder es wird aus der Längenmessung der elektronenmikroskopisch dargestellten Plasmid-DNA ermittelt.

Den GC-Gehalt der DNA kann man aus deren Dichte in CsCl berechnen (38), wobei die dazu notwendige genaue Dichtebestimmung in der analytischen Ultrazentrifuge durchgeführt wird (29, 22).

Die Untersuchungen zur Funktion sollen es ermöglichen, den physikalisch charakterisierten Plasmiden die genetischen Eigenschaften der infektiösen Drogenresistenz zuzuordnen.

Im einfachsten Fall ist dies für "Klasse 1"-R-Faktoren (2) als kointegrierte Plasmide (13) durch gemeinsamen Transfer von einheitlicher, extrachromosomaler DNA und entsprechender Funktion nachzuweisen. Bei diesen Molekülen ist der Resistenztransferfaktor (RTF) kovalent mit den Resistenzdeterminanten zu einem Plasmid integriert.

Für "Klasse 2"-R-Faktoren (2) bzw. "plasmid aggregate" (2, 13) sind zusätzliche Untersuchungen notwendig, da diese Resistenzfaktoren aus mehreren Plasmiden bestehen die nicht kointegrieren. Dabei können Transfer- und Resistenzgene auf verschiedenen Plasmiden liegen die sowohl gemeinsam als auch getrennt transferiert werden.

Eine Unterscheidungsmöglichkeit für "Klasse 1" und "Klasse 2" P-Faktoren bietet sich z. B. durch Phagentransduktion von Plasmid-DNA an (2). Die Plasmidelimination durch die Agenzien Acridinorange (20, 44), Natriumdodecylsulfat (40) und Ethidiumbromid (6) oder durch Thyminaushungerung von thyminauxotrophen Mutatanten (12) sind alternative Verfahren.

Eine weitere Nachweismöglichkeit für separierte Transfer- und Resistenzplasmide ergibt sich bei *E. coli* durch Plasmid-DNA-Transformation (14) von CaCl_2 -behandelten Rezipientenzellen (29).

Für die molekularbiologische Charakterisierung der P-Faktoren R323 und P12644, (mit den Derivaten P12644-1 und R12644-2), wurden folgende Methoden ausgewählt.

Die DNA-Isolierung erfolgte über CsCl -EthPr-Dichtegradientenzentrifugation. Das Molekulargewicht der Plasmide wurde aus deren Moleküllänge bestimmt, während der GC-Gehalt aus den DNA-Dichtemessungen in der analytischen UZ berechnet wurde.

In Kombination mit den parallel dazu durchgeführten genetischen Experimenten zur Plasmideliminierung, sowie dem Resistenztransfer und der DNA-Transformation, konnten die P-Faktoren identifiziert und klassifiziert werden.

C. Material und Methoden

1. Bakterienstämme

Stamm	genetische Markierungen	R-Faktor	Herkunft
E. coli UR323	(H ₂ S ⁺ ; Hly ⁺)	R323 ¹⁾	W. H. Traub Universität Erlangen
E. coli UR12644	(H ₂ S ⁺ ; Hly ⁺)	R12644 ¹⁾	
E. coli NC22	met, leu, thy, rif-r, nal-r,	-	A. Pühler Universität Erlangen
E. coli K12-1	str-r	-	"
E. coli MB101	r ⁻ , m ⁻	-	W. Göbel Universität Würzburg

Die R. lupini Stämme 1-20, 1-312, 1-44, 1-884, 1-486 und 1-682 wurden mir aus der Stammsammlung von W. Heumann zur Verfügung gestellt. Sie wurden zur Isolierung von chromosomaler DNA (Dichtestandard) verwendet.

1) Resistenzspektrum des R-Faktors (vgl. C. 11.).

Resistenz gegen: Ampicillin, Carbenicillin, Cephalothin, Chloramphenicol, Gentamicin, Kanamycin, Neomycin, Streptomycin, Tetracyclin, Tobramycin, Tripel-Sulfonamide

Abkürzungen:

met	Auxotrophie für Methionin		
leu	"	"	Leucin
thy	"	"	Thymin

rif-r	Resistenz gegen Rifampicin
nal-r	" " Nalidixinsäure
str-r	" " Streptomycin
carb-r	" " Carbenicillin
ceph-r	" " Cephalotin
sss-r	" " Tripel-Sulfonamide
r ⁻	restriktionsdefekt
m ⁻	modifikationsdefekt
H ₂ S ⁺	Schwefelwasserstoffproduktion
Hly ⁺	Hämolysinaktivität

2. Chemikalien

Substanz	Abkürzung	Bezugsquelle
Lysozym	-	Böhringer, Mannheim
Sarkosyl NL 30	-	Geigy, Basel (Schweiz)
Scintimix 4	-	Koch-Light Lab., Bucks (England)
Kanamycin	Kan	Grünenthal, Stolberg
Ampicillin	Amp	Höchst, Frankfurt
Tetracyclin	Tet	" "
Ribonuklease (reinst) PNAse		Serva, Heidelberg
Cytochrom C (aus Pferdeherz)		" "
Ethidiumbromid	EthBr	" "
Brij 58	-	" "
Streptomycin	Str	" "
Nalidixinsäure	Nal	" "
Thymidin	TdR	" "
Uridin	Urd	" "

Alle anderen Substanzen ohne speziellen Bezugsnachweis lieferte die Firma Merck, Darmstadt.

3. Medien u. Puffer

NB : Nutrient Broth (Difco) 8g/l

PA : Penassay Broth (Difco) 17,5g/l

MM : Minimalmedium nach W. Heumann (1968)

Zusätze: CAA (Casamino Acids, Difco) 0,2 %

Urd 200 µg/ml

TdR 2 µg/ml

Str 200 µg/ml

NaI 100 µg/ml

Amp 50 µg/ml

Kan 25 µg/ml

Tet 10 µg/ml

Für Festmedien wurden 18 g Bacto Agar (Difco) pro Liter zugesetzt.

Puffer:

PS (Puffer-Saline) wurde für Verdünnungsreihen gebraucht.

Zusammensetzung pro Liter: 7 g Na_2HPO_4 ; 3 g KH_2PO_4 ;
5 g NaCl; pH 7.

	Tris	EDTA	NaCl	pH
<u>TES</u> -Puffer: nach Bazaraal (1968)	0,05 M	0,005 M	0,05 M	8
<u>TEN</u> -Puffer: nach Cohen (1972)	0,02 M	0,001 M	0,02 M	8
<u>SET</u> -Puffer: Grinstead (1972)	0,05 M	0,100 M	0,15 M	8

Diese drei Puffer wurden in Zusammenhang mit der DNA-Isolierung und der DNA-Transformation verwendet.

4. Bakterienanzucht

4.1 Wuchsbedingungen

ÜK (Übernachtskultur)

Für *E. coli* wurden 10 ml PA beimpft und bei 37°C im Roller inkubiert.

Für *R. lupini* wurden 10 ml NB beimpft und bei 30°C im Roller inkubiert.

Anzucht im Schüttelwasserbad

Dazu wurden in der Regel 30 ml Medium in einem 100ml-Kolben beimpft und bei 30°C (*R. lupini*) bzw. 37°C (*E. coli*) im Schüttelwasserbad bewegt.

Die Bebrütung von *E. coli* Zellen auf Festmedien erfolgte gewöhnlich bei 37°C über Nacht.

4.2 Messung der optischen Dichte

Die Wachstumsphase von Bakterien in Flüssigkultur wurde durch Messung der optischen Dichte bei $\lambda = 580$ nm kontrolliert.

Meßgerät: Spectronic 20 (Bausch u. Lomb)

4.3 Ernte der Zellen

Sie erfolgte durch Zentrifugation der Bakteriensuspensionen bei 10 000 g, 5°C, 10 Minuten.

4.4 Lebendtitrierbestimmung

Der Lebendtitrier einer Bakteriensuspension wurde durch Ausspateln der Zellen (aus geeigneter Verdünnungsstufe) auf PA-Agar bestimmt.

5. Genetische Methoden

5.1 R-Faktor Transfer auf Festmedium

Vorkulturen (ÜK) von Donor- und Rezipientenstämmen wurden im Verhältnis 1 : 1 gemischt und davon 0,1 ml auf PA-Agar ausgespatelt. Die Bebrütung der Kreuzungsplatte erfolgte bei 37°C über Nacht. Der Bakterienrasen wurde mit insgesamt 10 ml PS-Puffer abgeschwemmt und daraus eine Verdünnungsreihe in PS angelegt. Die Selektion erfolgte durch Ausspateln auf selektiven Medien, bis zu einer Endverdünnung von 10^{-4} .

5.2 R-Faktor Transfer im Flüssigmedium

Diese Experimente wurden nach der Methode der unterbrochenen Paarung durchgeführt.

Die Vorkulturen von Donor und Rezipient wurden bis zu einem Titer 2×10^8 im Schüttelwasserbad bei 37°C inkubiert (Medium: PA-flüssig), im Verhältnis 1 : 1 gemischt und langsam weiterbewegt. Die in dieser gemeinsamen Anzucht stattfindende Konjugation wurde in 15' (30')-Abständen durch starkes Schütteln unterbrochen. Die Selektion erfolgte nach 1:100-Verdünnung durch Ausplattierung auf entsprechenden Selektionsplatten.

Sekundärselektion: Die von den einzelnen Selektionsmedien isolierten Kolonien wurden durch Überstempeln auf Antibiotikamedien auf das Vorhandensein der primär nicht selektionierten Antibiotikaresistenzen getestet.

5.3 Bestimmung der Transferfrequenz

Zur Bestimmung der Transferfrequenz der R-Faktoren wurde eine Lebendtitrierbestimmung der Bakterien aus der Kreuzungssuspension durchgeführt. (Bei Flüssigmediumkreuzung erfolgte diese Bestimmung zum letzten Meßpunkt). Die mit Kolonien bewachsenen PA-Platten der Titerbestimmung konnten durch Stempeltests auf charakteristische Donor- oder Rezipienteneigenschaften der Kolonien getestet werden. Dadurch wurde das Donor/Rezipienten-Verhältnis bestimmt. Die Transferfrequenz einer R-Faktorübertragung wurde aus $\frac{T \text{ resistenter Rezipientenzellen}}{T \text{ Donorzellen d. Kreuzungsgemischs}}$ berechnet.

5.4 Transformation von E. coli mit Plasmid-DNA

Die Experimente wurden analog dem von S. N. Cohen (1972) beschriebenen Verfahren durchgeführt. Als DNA-Rezipient diente der CaCl_2 vorbehandelte E. coli Stamm MB101. Die R-Faktor-DNA wurde über CsCl -EthBr-Dichtegradientenzentrifugation isoliert, von EthBr befreit und gegen TEN-Puffer dialysiert.

5.5 R-Faktor-Eliminierung

Dabei wurden die Bakterien, gewachsen in NB (pH 7.6), verschiedenen Konzentrationen an EthBr, Acridinorange und Natriumdodecylsulfat ausgesetzt (42). Die überlebenden Zellen wurden auf R-Faktorverlust getestet. Diese Versuche konnten im Labor von Dr. W. H. Traub durchgeführt werden.

6. Radioaktive DNA-Markierung

6.1 Markierungsbedingungen für E. coli thy⁻(thy⁺)

Eine ÜK wurde 1:100 in 5ml MM + CAA + TdR verdünnt und bei 37°C weiterinkubiert. Bei einem Titer von 10⁸ wurden 50 µCi ³H-TdR mit einer spez. Aktivität von 6.7/2.0 Ci/mMol (New England Nuclear, Dreieichenhain) supplementiert. Nach 2 - 3 weiteren Generationszeiten wurden die Zellen geerntet und aufgearbeitet. Die Markierung von thyminprototrophen E. coli Stämmen (8) wurde in MM+CAA+Urd durchgeführt.

6.2 Nachweis der Radioaktivität in der DNA

Die DNA-Bandenanalyse nach präparativer CsCl-Etbr-Dichtegradientenzentrifugation mit radioaktiv markierter DNA erfolgte durch Ausfällen der DNA und Bestimmung der Radioaktivität (7).

Dabei wurden 10µl/Fraktion auf Filterpapierplättchen von 1,5 x 1,5 cm aufgebracht. Die Präzipitation der DNA auf den Filtern erfolgte durch zweimalige Behandlung mit 5 %iger Trichloressigsäure in der Kälte. Nach dem Waschen der Filter in kaltem Äthanol und anschließendem Trocknen wurden sie zusammen mit je 5 ml Toluol (0,4 %ig an Scintimix 4) in einem Beckman Szintillationszähler (LS 230) auf Radioaktivität geprüft.

7. Zellaufschlußmethoden

7.1 Sarkosylverfahren (5)

In einem mit TES gepufferten System wurden durch Lysozymeinwirkung (1 mg/ml; 37°C; 20') Sphäroplasten gebildet. Die totale Lysis der Sphäroplasten konnte durch Zugabe von 10-%igem Sarkosyl erreicht werden. Dieses Lysat enthielt die gesamte Zell-DNA.

Rezept für eine 10 ml-Kultur:

- Ernte der Zellen; zweimaliges Waschen in TES
- Resuspension in 20-%iger Saccharose (0,25 ml)
- Lysozym-RNase Behandlung: je 1mg/ml Lösung (0,25 ml)
- Sarkosyllysis durch 10-%ige Lösung in 0,25 M EDTA (0,1ml)

7.2 "Cleared Lysate" (CL) Verfahren (23)

Bei diesem durch SET-Puffer stabilisierten System wird durch Lysozym und Brij 58-DOC⁺ Behandlung nur eine partielle Lysis der E. coli Zellen erreicht. Dieses durch Zentrifugation bei 48 000 g (30'; 5°C) gereinigte Lysat enthält nur noch einen Bruchteil der Gesamt-DNA.

Rezept für eine 10 ml-Kultur:

- Ernte der Zellen; zweimaliges Waschen in SET
- Vorsichtige Resuspension in Lysozym-1mg/ml/RNase 0,5 mg/ml-Lösung; 37°C; (0,6 ml)
- Detergenz-Behandlung: Brij-58 1,5 %ig + DOC⁺ 0,6%ig (0,2 ml)
- Zentrifugation bei 48 000 g (siehe oben)

⁺) Natriumdesoxycholat

8. CsCl-Dichtegradientenzentrifugation

8.1 Präparative Ultrazentrifugation zur Plasmidisolierung

Diese Methode der CsCl-Dichtegradientenzentrifugation in Gegenwart von EthBr (33) wurde zum Nachweis und zur Isolierung von Plasmid DNA verwendet. Dabei wurden die entsprechenden Zellysate mit CsCl (p.A.) und TES (SET) vermischt. Das Gradientenvolumen war 5 ml, die Eingangsdichte (31) betrug $1,60 \pm 0,01$ g/ml CsCl. Die EthBr-Konzentration betrug 200 µg/ml.

Das restliche Röhrchenvolumen wurde mit dünnflüssigem Paraffin ausgefüllt. Die CsCl-Einwaage wurde nach der Gleichung von Robinson (1955) berechnet. Der refraktive Index (n_D^{25}) wurde mit einem Zeiss Refraktometer gemessen; die Dichte wurde daraus nach der Gleichung von Ifft (1961) bestimmt. Die Zentrifugation erfolgte in einem 75-Ti-Rotor einer Beckman L2-65B-Zentrifuge.

Zentrifugationsbedingungen: 34000 Upm; 25° C; 40 bis 50 Stunden Laufzeit.

Die Fraktionierung der Gradienten erfolgte nach Anstechen des Röhrchenbodens durch Sammeln von 6 Tropfen pro Fraktion.

Anmerkung: Die als Dichtereferenz verwendete DNA des Resistenzfaktors RP4 wurde mir von A. Pühler zur Verfügung gestellt.

8.2 Analytische Ultrazentrifugation zur DNA-Dichtebestimmung

Diese Methode (29) wurde zur Dichtebestimmung von DNA verwendet. Dabei wurde die aufbereitete DNA mit entsprechender Pufferung (TES, TEN, SET) und CsCl (suprapur) vermischt. Das Gradientenvolumen war 0.4 ml, die CsCl-Eingangsdichte betrug 1,71 g/ml. Die Zentrifugation wurde in Doppelsektorzellen (Kef-Mittelstück, 12 mm) eines An-F-Ti-Rotors, in einer analytischen Ultrazentrifuge (Model E, Beckman), durchgeführt.

Zentrifugationsbedingungen: 44 000 Upm; 25°C; 25 bis 30 Stunden;

Die Bandenidentifizierung erfolgte über UV-Absorption bei 262 nm.

Die Registrierung der DNA-Verteilung wurde mit einem photoelektrischen Scanner (Beckman), in Kombination mit einem externen 10" Recorder (Beckman), durchgeführt. Die eingesetzten DNA-Mengen betrugen 1-5 µg/ml pro DNA-Spezies. Die Dichtebestimmung der DNA erfolgte über Zugabe eines internen Dichtestandards (R. lupini DNA, $\rho = 1.725$ g/ml) und der entsprechenden Berechnung nach der Gleichung von Ifft (1961):

$$\rho = \rho_1 + \frac{\omega^2}{2R} (x^2 - x_1^2)$$

Zur Berechnung der Dichte in Bezug auf den Standard wurden in dieser Gleichung ρ_1 durch $\rho_{\text{Ref.}}$ und x_1 durch $x_{\text{Ref.}}$ ersetzt.

ρ = Dichte der Probe

ρ_1 = Eingangsdichte

$\rho_{\text{Ref.}}$ = Dichte der Referenz-DNA

ω = Winkelgeschwindigkeit

B = Konstante (im angewandten Bereich : $1,19 \times 10^9$)

x = Abstand der Probenbande vom Rotationszentrum

x_1 = Abstand des Isokonzentrationspunktes vom Rotationszentrum

$x_{\text{Ref.}}$ = Abstand der Referenz-DNA-Bande vom Rotationszentrum

Der GC-Basenanteil der DNA wurde aus der DNA-Dichte (38) wie folgt berechnet:

$$\text{GC} = \frac{S - 1,66}{0,098}$$

9. DNA-Aufbereitung

9.1 EthBr-Extraktion

Die DNA-haltigen Fraktionen wurden durch mehrmaliges Ausschütteln mit Isoamylalkohol von EthBr befreit.

9.2 Dialyse

Nach der EthBr-Extraktion wurden die DNA-Proben gegen entsprechende Puffer (TES; TEN; SET) dialysiert.

Puffervolumen: 3 x 1 Liter

Temperatur: 8°C

Dialysiermembran 8x100 FT (Union Carbide Corporation, Chicago)

9.3 Konzentrationsbestimmung

Die DNA-Konzentration in den dialysierten Proben wurde photometrisch über die Beziehung

$$1.0 A_{260} = 50 \mu\text{g/ml DNA}$$

bestimmt.

Meßgerät: PMQ II (C. Zeiss, Oberkochen)

10. Elektronenmikroskopie

1.1 Präparation von Plasmid-DNA

Die Probenpräparation zur elektronenmikroskopischen Darstellung der DNA basierte auf den Grundlagen der Mikromethode von Lang (1970) und der Kontrastierung nach Davis (1971).

Stammlösung:

2,56 ml aqua bidest.

0,30 ml 2 M $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ -Lösung (1mM EDTA)

0,08 ml Cytochrom c-Lösung (0,01%)

2,94 ml, davon 0,49 ml + 0,01 ml DNA-Lösung

Als DNA-Lösung diente die zentrale Plasmid-Fraktion einer Bande eines CsCl -EthBr-Gradienten, oder alternativ die gesammelte Plasmidbande (vgl. D.1.4).

Von dieser Mischung wurden Tropfen mit einem Volumen von ca. 0,04 ml auf eine mit Teflon beschichtete Oberfläche gesetzt.

Nach 30 bis 45 Minuten wurde ein mit Parlodion beschichtetes Kupfernetz kurz auf die Tropfenoberfläche getupft. Anschließend wurde der Objektträger 10 Sekunden lang in 90 % Äthanol (0,1 mM Uranylacetat - HCl) getaucht, weitere 10 Sekunden in reinem Äthanol gewaschen und abschließend 30 Sekunden mit Isopentan behandelt. Nach dem Trocknen der Netze erfolgte die Kontrastierung der DNA durch Kegelbedampfung mit Pt/Ir (Bedampfungsanlage: Joel JEE4B, Japan). Die elektronenmikroskopischen Bilder wurden mit einem JEM 7A - Gerät (Joel, Japan) aufgenommen.

10.2 Längenmessung der Plasmid-DNA

Das Elektronenmikroskop-Negativ wurde über einen Projektor (Avanti: Liesegang, Düsseldorf) 16-fach vergrößert und die Kontur der Moleküle auf Papier nachgezeichnet. Die Länge dieser Abbildung wurde mit einem Kurvenmeßgerät bestimmt. Die reale Moleküllänge wurde durch Division mit dem Vergrößerungsfaktor ermittelt. Der Vergrößerungsfaktor setzte sich zusammen aus der elektronenmikroskopischen Primärvergrößerung (geeicht mit Hilfe eines Gitterstandards) und der Projektionsvergrößerung. Die Berechnung des Molekulargewichts der DNA wurde aus der Moleküllänge nach folgender Beziehung (27) durchgeführt. Das Molekulargewicht doppelsträngiger DNA beträgt 207 ± 4 amu pro 10^{-8} cm.

11. Antibiotogramme

Das Resistenzspektrum von Bakterienstämmen wurde über Plättchenantibiotogramme nach Bauer und Kirby (1966) bestimmt.

Antibiotika Abkürzungen:

Amp	Ampicillin
Carb	Carbenicillin
Ceph	Cephalothin
Chlor	Chloramphenicol
Gm	Gentamicin
Km	Kanamycin
Na	Nalidixinsäure
Nm	Neomycin
Nitr	Nitrofurantion
PB	Polymyxin B
Sm	Streptomycin
Tc	Tetracyclin
Tob	Tobramycin
SSS	Tripel-Sulfonamide
SXT	Trimethoprim-Sulfamethoxazol

S = sensitiv R = resistent

12. H₂S-Nachweis (41)

Die zu testenden Stämme wurden als Stichkulturen in einem modifizierten Motility-Indol-Ornitin-H₂S-Medium (MIOH) angeimpft und bei 35°C über Nacht bebrütet. Schwarzfärbung des Mediums zeigte H₂S-Produktion an. H₂S-Nachweis sowie Test der Resistenzspektren wurden im Labor von W. Traub, Universität Erlangen, durchgeführt.

D. E r g e b n i s s e

1. Methodik der Plasmidanalyse

Die Plasmidisolierung und -analyse bildeten die Grundlage der molekularbiologischen Untersuchung der R-Faktoren.

Hierzu wurden folgende Methoden verwandt:

- Die präparative CsCl-EthBr-Dichtegradientenzentrifugation (Plasmidnachweis, -reinigung, -DNA-Isolierung)
- Die elektronenmikroskopische Darstellung (Plasmidlänge, Molekulargewichtsbestimmung)
- Die analytische CsCl-Dichtegradientenzentrifugation (Dichtebestimmung, GC-Anteil)

1.1 Nachweis von Plasmid-DNA

Durch CsCl-EthBr-Dichtegradientenzentrifugation (33) kann extrachromosomale DNA in der ccc-Form nachgewiesen werden. Die Plasmid-DNA ist dabei in einer distinkten Bande unterhalb der chromosomalen DNA angereichert.

Die Fluoreszenz der DNA-EthBr-Banden, die bei Bestrahlung mit UV-Licht auftritt (46), ermöglicht ihre Auffindung.

Mit Hilfe dieser Methode wurden bei beiden E. coli-Stämmen, UR323 und UR12644, Plasmide nachgewiesen (vgl. Abb. 1A). Für den E. coli Stamm NC22 konnte auf diese Art und Weise gezeigt werden, daß er kein Plasmid beherbergt (Abb. 1B).

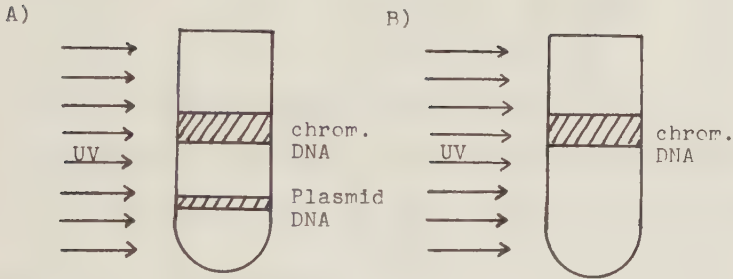


Abb. 1: A) Qualitativer Plasmidnachweis durch DNA-Fluoreszenz im UV-Licht, nach CsCl-EthBr-Dichtegradientenzentrifugation von UR323- u. UR12644-DNA.
B) Kontrollversuch mit einem E. coli Stamm (NC22) ohne Plasmid-DNA.

1.2 Einfluß der Lysismethode auf den Plasmidanteil

Zur quantitativen Ermittlung des Plasmidgehalts wurde die DNA der E. coli Stämme UR323 und UR12644 selektiv mit ^3H -TdR markiert (8).

Die Anzucht der Stämme erfolgte entsprechend den Markierungsbedingungen in 10 ml Medium.

Kurz vor Beginn der Lysisprozedur wurden beide Kulturen in je zwei gleiche Volumina geteilt, um zwei unterschiedliche Zellaufschlußmethoden parallel testen zu können.

a) Das Sarkosylverfahren

b) Das CL-Verfahren

Die Desoxyribonukleinsäuren aus den so erhaltenen Zellysaten

-UR 323 (Sarkosyl)
-UR 323 (CL)
-UR 12644 (Sarkosyl)
-UR 12644 (CL)

wurden in 4 separaten CsCl-EthBr-Dichtegradienten bandiert. Die Bandenidentifizierung erfolgte nach Fraktionierung der Gradienten durch anschließende Bestimmung des präzipitierbaren Tritiumanteils jeder Fraktion.

Das Zentrifugationsergebnis für die UR323-Lysate ist in Abb. 2 (S.24) dargestellt. Es zeigte sich, daß nach beiden Zellaufschlußmethoden neben der chromosomalen DNA auch Plasmid-DNA im dichteren Gradiententeil bandierte. Die quantitative Auswertung zur Ermittlung des Plasmidgehalts (13) beruhte auf einem Vergleich des Anteils der radioaktiv markierten DNA in der Plasmidbande zum Gesamtgehalt an radioaktiver DNA im Gradienten. Diese Ergebnisse sind im oberen Teil der Tabelle 1 (S. 23) zusammengefaßt. Die CL-Methode zeichnete sich gegenüber dem Sarkosylverfahren dadurch aus, daß der Anteil der chromosomalen DNA drastisch reduziert wurde. Gleichzeitig wurde aber auch die Plasmidausbeute auf 1/5 verringert.

E. coli Stamm	Zellaufschluß- verfahren	Anteil der Plasmid-DNA (%)	Anteil der chrom. DNA (%)	Plasmid-DNA chrom. DNA
UR323	Sarkosyl	2.0	98.0	1 : 49
UR323	CL +)	0.4	1.6	1 : 4
UR12644	Sarkosyl	3.0	97.0	1 : 32
UR12644	CL +)	0.65	1.9	1 : 3
NC22(R12644)	Sarkosyl	1.75	98.25	1 : 56

+) Die Anteilsberechnungen beziehen sich auf den Gesamt-DNA-Gehalt der Sarkosyllysis.

Tabelle 1: Anteilsbestimmungen von Plasmid-DNA und chromosomaler DNA bei unterschiedlichen E. coli Stämmen, in Abhängigkeit von der Lysismethode.

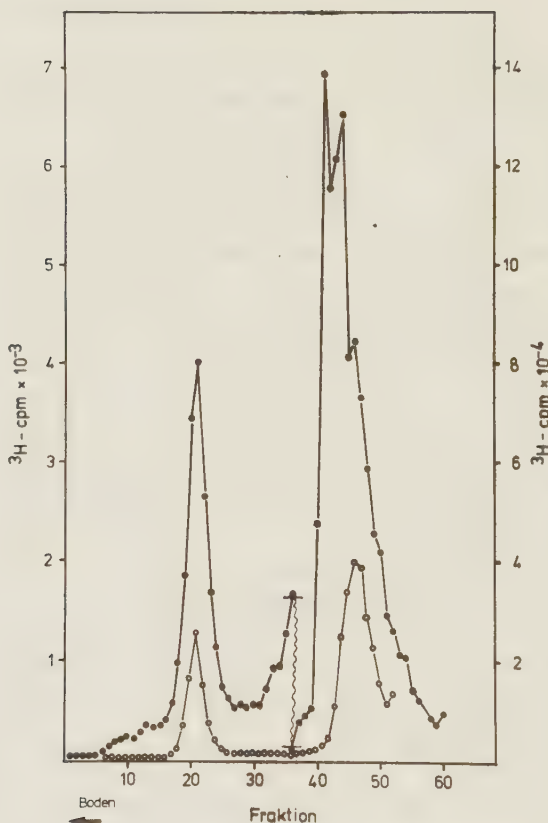


Abb. 2: DNA-Bandierung des plasmidtragenden Stammes *E. coli* UR323 im CsCl-EthBr-Dichtegradienten. Der Stamm war mit ^3H -TdR markiert worden. Die Lysis der geteilten Kultur erfolgte nach zwei unterschiedlichen Methoden. Die Zentrifugation wurde in separaten Gradienten durchgeführt.

(●) DNA-Bandierung nach Sarkosyllysis

(○) DNA-Bandierung des "cleared lysate"

Beachte: Zur Darstellung der chromosomalen DNA-Bande nach Sarkosyllysis wurde ein veränderter Radioaktivitätsmaßstab (rechte Skala) verwendet. Der Wechsel ist durch die Wellenlinie markiert.

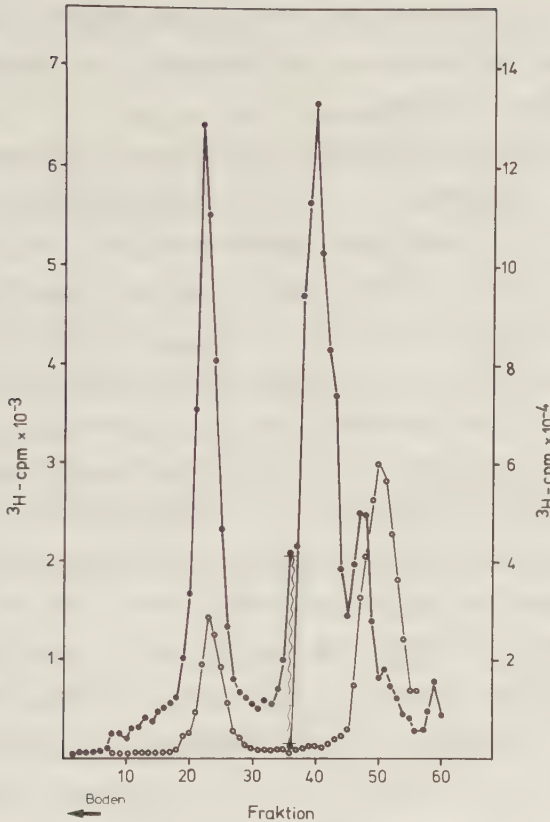


Abb. 3: DNA-Bandierung des plasmidtragenden Stammes *E. coli* UR12644 im CsCl -EthBr-Dichtegradienten. Der Stamm war mit ^3H -TdR markiert worden. Die Lysis der geteilten Kultur erfolgte nach zwei unterschiedlichen Methoden. Die Zentrifugation wurde in separaten Gradienten durchgeführt.

(●) DNA-Bandierung nach Sarkosyllysis
(○) DNA-Bandierung des "cleared lysate"

Beachte: Zur Darstellung der chromosomalen DNA-Bande nach Sarkosyllysis wurde ein veränderter Radioaktivitätsmaßstab verwendet (rechte Skala). Der Wechsel ist durch die Wellenlinie markiert.

Der im analogen Verfahren getestete Stamm UR12644 zeigte eine ähnliche DNA-Verteilung im Gradienten, in Abhängigkeit von der Lysismethode (Abb. 3, S.25).

Der reduzierte Abstand zwischen Plasmidbande und chromosomaler Bande im DNA-Profil des Dichtegradienten nach Sarkosyl-lysis beruht auf einem Fraktionierungsartefakt. Die Erklärung hierfür leitet sich von den angewandten Zentrifugationsbedingungen (Festwinkelrotor) ab. In Abb. 4 wird gezeigt, daß die Bandenposition im Röhrchen während der Zentrifugation unterschiedlich zur Bandenposition im aufgestellten Röhrchen (bei Fraktionierung) ist. Aufgrund von Wechselwirkungen der chromosomalen DNA mit der Wand des Zentrifugenröhrchens kann beim Fraktionieren ein Herunterziehen dieser DNA erfolgen, wodurch die Banden angenähert werden. Der wahre Abstand ist durch die Bandierung der DNA des "Cleared Lysate" gegeben. Hier kann dieses Artefakt nicht auftreten, da der Anteil der chromosomalen DNA vermindert und die DNA nicht viskos ist.

A)



B)

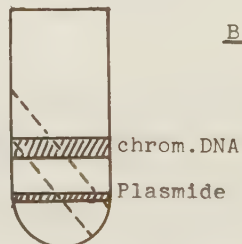


Abb. 4: A) DNA-Bandenposition während der Zentrifugation im Festwinkelrotor
B) Bandenposition im aufgestellten Röhrchen
(Die unterbrochenen Linien markieren die vorherige Bandenpositionen)

Unter Berücksichtigung dieses Aspekts ergibt sich für den Stamm UR12644 eine qualitativ ähnliche Verteilung der DNA-Spezies im Dichtegradienten wie für UR323. Die Ergebnisse der quantitativen Auswertung sind im mittleren Teil der Tabelle 1 (S. 23) wiedergegeben. Sie unterscheiden sich nur geringfügig von den DNA-Proportionen bei UR323. So wurde durch die CL-Methode der Plasmidanteil auf 1:4,5 reduziert, während die chromosomale DNA im Verhältnis 1:51 gegenüber dem Sarkosylverfahren verringert wurde.

Die absoluten Werte zeigen jedoch im Stamm UR12644 mit 3 % einen höheren Plasmidanteil gegenüber UR323 (2 %) an.

1.3 Nachweis von Plasmid-DNA nach R-Faktor-Transfer

Aus der gleichzeitigen Existenz von Plasmid-DNA und multipler, transferierbarer Drogenresistenz in einem Bakterium (UR323, UR12644) läßt sich noch kein kausaler Zusammenhang ableiten. Eine entsprechende Korrelation ist jedoch gesichert, wenn gleichzeitig mit dem Transfer von Resistenzgenen auch Plasmid-DNA auf einen Rezipienten übertragen wird. Dieses Experiment wurde für beide der multiresistenten E. coli Stämme, UR323 und UR12644, durchgeführt.

Das Ergebnis soll anhand der Übertragung des R323-Faktors auf E. coli NC22 demonstriert werden. Für den Resistenztransfer wurde dabei mit Amp, Kan oder Tet selektioniert. Zur Gegenselektion des R-Faktor-Donors wurde dem Medium Nal zugesetzt.

Nachdem das anschließend erstellte Antiblogramm die Übertragung sämtlicher Resistenzen des R323 gezeigt hatte, wurde eine Plasmidanalyse durchgeführt. Die DNA war mit Tritium-TdR radioaktiv markiert worden.

In Abb. 5 (S. 29) ist die Verteilung der radioaktiven DNA des Stammes NC22(R323) im CsCl-Gradienten dargestellt.

Durch die Identifizierung der Plasmidbande für den Stamm NC22(R323) konnte die Korrelation Plasmid-DNA/Antibiotikaresistenz bestätigt werden. Die quantitative Bestimmung des Plasmidanteils an der Gesamt-DNA ist dem unteren Teil der Tab. 1 (S. 23) zu entnehmen. Dabei ist anscheinend der Anteil der Plasmid-DNA im Stamm NC22(R323) geringer als in UR323.

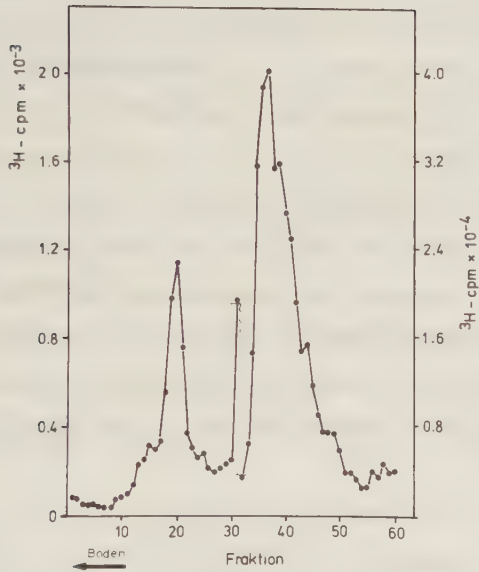


Abb. 5: DNA-Bandierung durch CsCl-EthBr-Dichte-gradientenzentrifugation eines Sarkosyllsates von *E. coli* NC22(R323). Die Anzucht des Stammes war in ^3H -TdR-haltigem Medium erfolgt. Beachte: Zur Darstellung der chromosomalen DNA-Bande wurde ein veränderter Radioaktivitätsmaßstab verwendet (rechte Skala). Der Wechsel ist durch die Wellenlinie markiert.

1.4 Plasmidisolierung ohne radioaktive DNA-Markierung

Zur Isolierung von Plasmid-DNA bei allen analogen Experimenten wurde ein vereinfachtes Verfahren entwickelt. Es wurden Bakterien aus 30 ml-Kulturen geerntet, die Zell-DNA war jedoch nicht radioaktiv markiert worden. Der Zellaufschluß erfolgte nach dem Sarkosylverfahren; die Abtrennung der Plasmid-DNA wurde entsprechend den Standardbedingungen durch CsCl-EthBr-Dichtegradientenzentrifugation erreicht. Der Nachweis der Plasmidbande erfolgte qualitativ aufgrund der Fluoreszenz im UV-Licht. Zur DNA-Isolierung wurde das Zentrifugenröhrchen seitlich mit einer Spritze angestochen und die Plasmidbande abgezogen (Abb. 6).

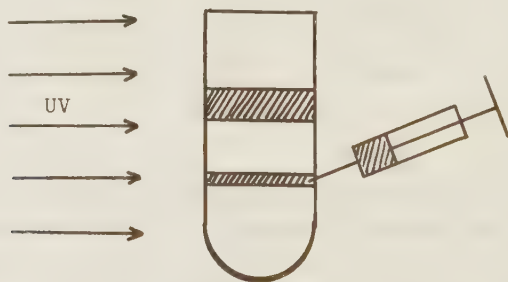


Abb. 6: Isolierung von Plasmid-DNA durch Abziehen der Bande.

Vorteile dieser Methode:

- Einsparung der Radioaktivität
- Reduktion der Fraktionierungsartefakte
- effektivere Nutzung der Gradientenkapazität (30 ml-Kulturen)
- Zeitersparnis durch Wegfall der Tropfenfraktionierung, sowie durch Wegfall der Radioaktivitätsmessungen nach der Filtermethode

Nachteile der Methode:

- Die DNA-Bestimmungen sind nicht quantitativ.
- Die DNA kann nicht zu Sedimentationsstudien im Saccharosegradienten verwendet werden.
- Es erfolgt eine Verdünnung und Vermischung der Plasmid-Fraktion.

Die DNA der isolierten Plasmidfraktionen wurde ohne weitere Aufbereitung zur Präparation für die elektronenmikroskopische Darstellung verwandt.

Nach Aufbereitung der DNA erfolgte deren Dichtebestimmung in der analytischen UZ. In Sonderfällen wurde die aufbereitete DNA zur Transformation von E. coli Zellen verwendet.

1.5 Isolierung von R. lupini-Referenz-DNA

Für die DNA-Dichtebestimmung in der analytischen UZ ist es sinnvoll, die zu bestimmende DNA-Dichte über einen internen Dichtestandard zu messen. Die gewünschten Eigenschaften dieses Standards, hohes Molekulargewicht und Dichteunterschied zur Proben-DNA (E. coli-Plasmide), wurden von der chromosomalen *Phizobium lupini*-DNA erwartet. Zu diesem Zweck wurde die chromosomale DNA aus einer Reihe von *P. lupini* Stämmen und dem E. coli Stamm NC22 isoliert. Dabei wurden nicht radioaktiv markierte 10 ml-Kulturen verwandt. Der Zellaufschluß erfolgte nach dem Sarkosylverfahren. Nach der CsCl-Dichtegradientenzentrifugation ($\rho = 1,71 \text{ g/ml}$) erfolgte die Tropfenfraktionierung, wobei die viskosen DNA-Fractionen gesammelt wurden.

Bei den weiteren Experimenten zur DNA-Dichtebestimmung wurde als interner Dichtestandard die DNA des *R. lupini* Stammes 1-312 verwendet. Die jeweils eingesetzten Konzentrationen betrugen 1 - 5 µg/ml.

Stamm	Wuchsphase bei der Lysis	DNA-Dichte (g/ml)
<i>E. coli</i> NC22	stationär	1.7100
<i>E. coli</i> NC22	log	1.7100
<i>R. lupini</i> 1-312	stationär	1.7248
<i>R. lupini</i> 1-312	log	1.7250
<i>R. lupini</i> 1-20	stationär	1.7249
<i>R. lupini</i> 1-20	log	1.7252
<i>R. lupini</i> 1-884	stationär	1.7253
<i>R. lupini</i> 1-884	log	1.7248
<i>R. lupini</i> 1-44	log	1.7251
<i>R. lupini</i> 1-486	stationär	1.7248
<i>R. lupini</i> 1-682	stationär	1.7248

Tabelle 2: DNA-Dichten verschiedener Bakterienstämme aus unterschiedlichen Wuchsphasen. Die Dichten wurden in der analytischen UZ über einen internen Dichtestandard bestimmt.

log: $OD_{580} = 0.45 - 0.8$

stationär: $OD_{580} = 1.1 - 1.6$

1.6 Dichtebestimmung von R. lupini-Referenz-DNA

Die isolierte R. lupini-DNA wurde durch CsCl-Dichtegradientenzentrifugation in der analytischen UZ getestet. Als Dichtemarkierung diente die chromosomale DNA aus E. coli NC22. Für diese DNA wurde die E. coli Dichte von 1.710 g/ml angenommen. Die dabei erzielten Ergebnisse sind in Tab. 2 (Seite 32) aufgeführt. Der Mittelwert der R. lupini-DNA-Dichte berechnet sich danach zu:

$$1.725 \pm 0.0002 \text{ g/ml}$$

Die Ermittlung des GC-Gehalts nach Schildkraut (1962) ergibt für die R. lupini-DNA den Wert von 66,5 % GC.

Durch Einführung eines weiteren Dichtestandard wurde sowohl der bisher verwendete Dichtestandard (E. coli DNA) als auch der neubestimmte Dichtestandard (R. lupini DNA) kontrolliert. Die neueingeführte DNA war der Resistenzfaktor RP4 mit einer Dichte von 1.72 g/ml (Saunders, 1972). Dadurch sollte es möglich sein, neben der chromosomalen DNA von E. coli und R. lupini eine 3. DNA im CsCl-Gradienten darzustellen. Diese Annahme konnte im Experiment bestätigt werden (Abb. 7, S. 34). Berechnet man dabei, ausgehend von der E. coli-DNA-Bande (Dichte: 1,71 g/ml), die Dichten der RP4-DNA und der R. lupini-DNA, so ergeben sich dabei für RP4 1,7196 g/ml und für R. lupini 1,7246 g/ml. Durch dieses Experiment wurden die bereits vorher erzielten Ergebnisse bestätigt.

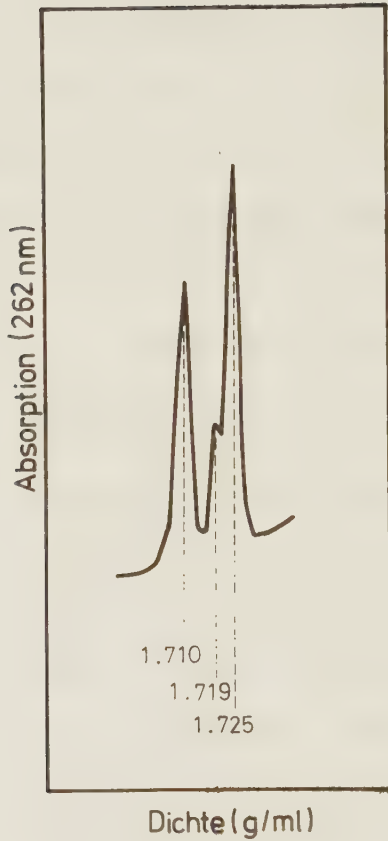


Abb. 7: DNA-Dichtebestimmung von *R. lupini*-DNA und RP4-DNA im CsCl-Dichtegradienten in der analytischen UZ. Die DNA-Bandierung wurde durch Absorptionsmessungen bei 262 nm analysiert.

$\rho = 1.710 \text{ g/ml} \hat{=}$ chromosomaler *E. coli*-DNA (NC22)

$\rho = 1.7196 \text{ g/ml} \hat{=}$ RP4-DNA

$\rho = 1.725 \text{ g/ml} \hat{=}$ chromosomaler *R. lupini*-DNA(1-312)

1.7 Dichtebestimmung der Gesamt-DNA aus UR323 und UR12644

Dieses Experiment sollte die Fragen beantworten:

- a) Welche Dichte kommt der chromosomalen DNA der beiden Plasmid-tragenden Stämme zu?
- b) Läßt sich die Plasmid-DNA auf Grund eines Dichteunterschieds identifizieren?

Die Gesamt-DNA der beiden Stämme wurde dazu über einen präparativen CsCl-Gradienten isoliert (vgl. D.1.4).

Die Dichtemessung für den Stamm UR323 ist in Abb. 8A (S. 36), für den Stamm UR12644 in Abb. 8B dargestellt. Es läßt sich für beide Stämme jeweils nur noch eine Bande neben der Referenz-DNA erkennen. Die Dichteberechnung ergab in beiden Fällen 1,711 g/ml. Daneben konnten keine weiteren DNA-Banden nachgewiesen werden. Das bedeutet entweder, daß die Plasmid-DNA beider Stämme E. coli DNA-Dichte hat, oder daß die angewandte Methode zu unempfindlich ist, um geringe DNA-Mengen neben der chromosomalen DNA exakt zu messen. Die Dichte der Plasmide wurde deshalb über separate Isolierungen bestimmt.

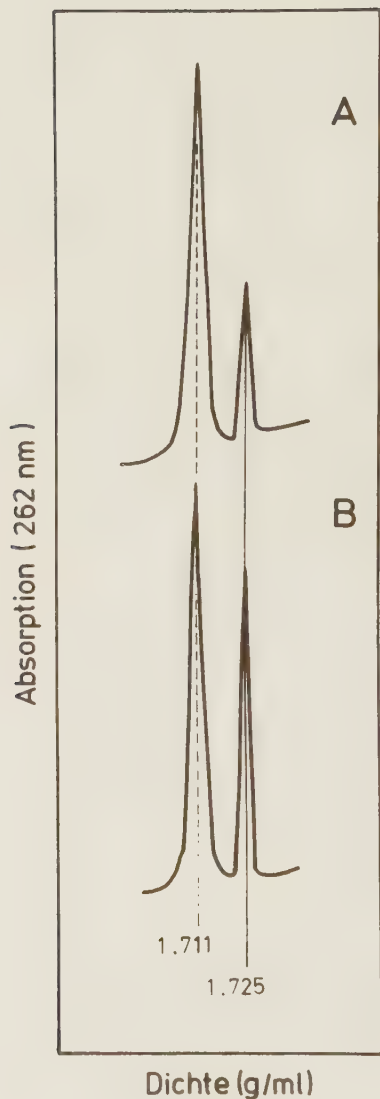


Abb. 8: DNA-Dichtebestimmung durch CsCl-Dichtegradientenzentrifugation in der analytischen UZ. Die DNA-Bandierung wurde durch Absorptionsmessungen bei 262 nm analysiert.

A) Dichteprofil der Gesamt-DNA des *E. coli* Stammes UR323.

$\rho = 1.725$ g/ml: Ref.DNA (*R. lupini*)

$\rho = 1.711$ g/ml: Proben-DNA aus UR323

B) Dichteprofil der Gesamt-DNA des *E. coli* Stammes UR12644.

$\rho = 1.725$ g/ml: Ref.DNA (*R. lupini*)

$\rho = 1.711$ g/ml: Proben-DNA aus UR12644

2. Charakterisierung des Resistenzfaktors R323

Der Bakterienstamm UR323 wurde aus Urinproben eines Patienten isoliert und typisiert (43).

UR323 erwies sich dabei als ein E. coli Stamm, der gegen eine Vielzahl von Antibiotika und Chemotherapeutika resistent war. Weitere interessante Eigenschaften dieses Stammes wurden durch den Nachweis von H_2S -Produktion und Hämolyse von Hasenblut aufgezeigt. Außerdem konnte die Gesamtheit der Drogenresistenzen auf E. coli und Klebsiella übertragen werden. Die Fähigkeit zur H_2S -Produktion wurde in keinem Fall mittransferiert. Der gemeinsame Transfer der 11 Antibiotikaresistenzen sprach für das Vorliegen eines infektiösen R-Faktors. In diesem Teil der Arbeit sollte nun der Nachweis von extrachromosomaler DNA im Stamm UR323 erbracht werden. Außerdem sollte die Zuordnung der Resistenzgene zur entsprechenden Plasmid-DNA bewiesen werden.

Durch die molekularbiologische Charakterisierung des R-Faktors wurden Aufschlüsse über sein Molekulargewicht und seinen GC-Gehalt erwartet. Zu Beginn der Experimente wurde das Resistenzspektrum (3) von UR323 noch einmal getestet. Es zeigte sich, daß die 11 beschriebenen Resistenzen noch vorhanden waren (Tab. 3, S. 38).

Übereinstimmend mit den von Traub (1975) publizierten Ergebnissen war der Nachweis der H_2S -Produktion dieses Stammes und der negative Befund eines Experiments zur Elimination von Resistenzgenen. Dabei konnte unter 120 selektionierten Kolonien kein R-Faktor-Verlust gefunden werden.

Droge Stamm	Amp	Carb	Ceph	Chlor	Gm	Km	Na	Nm	Nitr	PB	Sm	Tc	Tob	SSS	SxT
	UR323	R	R	R	R	R	S	R	S	S	R	R	R	R	S
NC22 NC22 (R323)	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	R	R
	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R

Tabelle 3: Antibiogramme verschiedener *E. coli* Stämme mit und ohne den Resistenzfaktor R323. Die verwendeten Abkürzungen sind im Methodenteil C.11 erklärt.

R = resistenz

S = sensitiv

2.1 Plasmidanalyse des multiresistenten E. coli Stammes UR323

2.1.1 Nachweis und Isolierung von Plasmid-DNA aus UR323

Der Nachweis wurde über CsCl-EthBr-Dichtegradientenzentrifugation sowohl qualitativ als quantitativ durchgeführt und ist bereits ausführlich im Ergebnisteil D.1.1 und D.1.2 beschrieben. Die Plasmidfraktion für die weiteren Untersuchungen wurde dabei über die in D.1.4 beschriebene Methode gewonnen.

2.1.2 Darstellung und Längenmessung der Plasmide aus UR323

Die elektronenmikroskopische Abbildung der Plasmidmoleküle (26,16) ist unter C.10.1 beschrieben. Die Aufnahmen dieser Plasmide wurden zur Längenmessung und der daraus resultierenden Molekulargewichtsbestimmung (27) verwandt. Im Elektronenmikroskop konnte Heterogenität der Plasmidlängen beobachtet werden. Die Längenverteilung dieser Plasmide wird in Abb.9(S.41) gezeigt. Neben einer geringen Anzahl von Molekülen, deren Längenverteilung im Bereich von 0 - 15 μm liegt, konnten 2 in der Länge deutlich verschiedene Plasmidklassen nachgewiesen werden. Diese Befunde sind zusammen mit den entsprechenden Molekulargewichten in Tab. 4 (S. 40) enthalten. Abbildung 10 (S. 42) stellt eine elektronenmikroskopische Aufnahme dar, die ein Plasmid der Längensklasse 1 und mehrere Plasmide der Längensklasse 2 zeigt.

Aufgrund der heterogenen Längenverteilung der Plasmide im Stamm UR323 war eine Zuordnung der Resistenz- und Transfergene zu entsprechenden Plasmiden noch nicht möglich.

Stamm	Plasmid- klasse	Anzahl d. vermess. Moleküle	mittl. Länge +Standardab- weichung(μ m)	Molekularge- wicht amu x 10 ⁶
UR323	1	16	33.6 $\pm$ 1.8	70
UR323	2	121	1.21 $\pm$ 0.07	2.5
NC22 (R323)	1	15	32.2 $\pm$ 2.0	67

Tabelle 4: Längenmessung von Plasmiden aus E. coli UR323 und E. coli NC22 (R323).

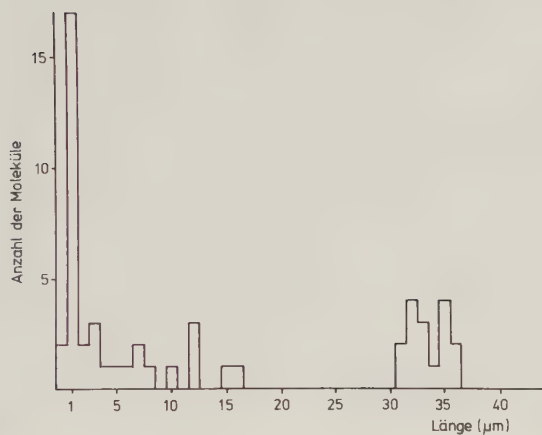


Abb. 9: Längenverteilung der Plasmide aus *E. coli* UR323.

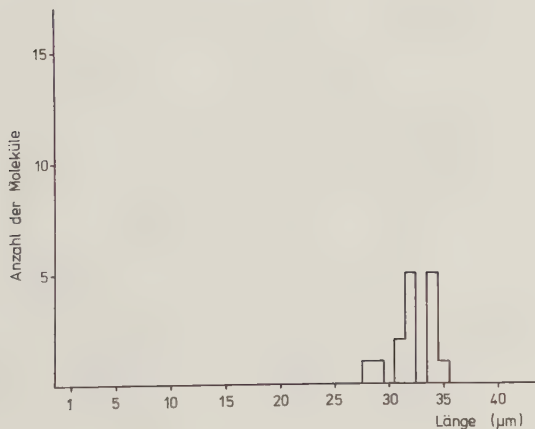


Abb. 14: Längenverteilung der Plasmide aus *E. coli* NC22 (R323).



Abb. 10: Plasmid-DNA der Längenklassen 1 ($33.6 \pm 1.8 \mu\text{m}$) und 2 ($1.2 \mu\text{m}$) aus *E. coli* UR323.

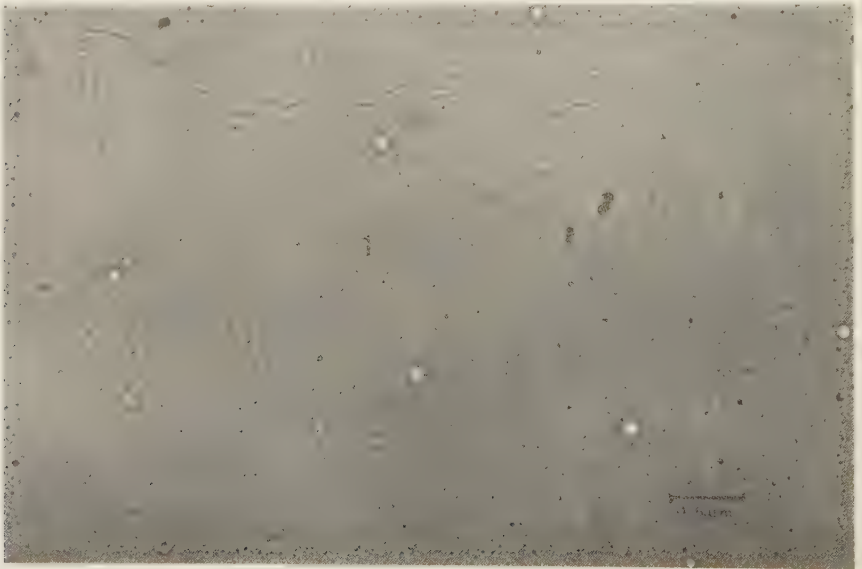


Abb. 13: Plasmid-DNA der Längensklasse 1 ($32.2 \pm 2 \mu\text{m}$) aus *E. coli* NC22 (R323).

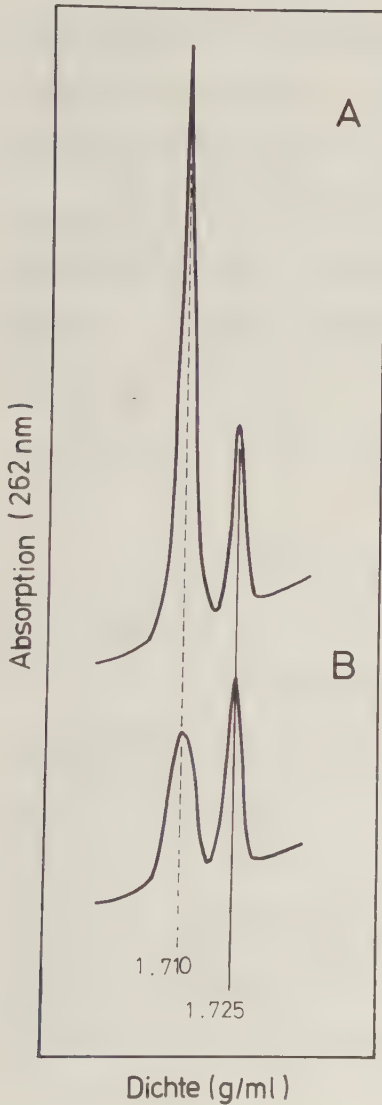


Abb. 11: DNA-Dichtebestimmung durch CsCl-Dichtegradientenzentrifugation in der analytischen UZ. Die DNA-Bandierung wurde durch Absorptionsmessungen bei 262 nm analysiert.

A) Dichteprofil der Plasmid-DNA des Stammes *E. coli* UR323

$\rho = 1,725$ g/ml: Ref.DNA (*R. lupini*)

$\rho = 1,710$ g/ml: Plasmid-DNA aus UR323

B) Dichteprofil der Plasmid-DNA des Stammes *E. coli* NC22 (R323)

$\rho = 1,725$ g/ml: Ref.DNA (*R. lupini*)

$\rho = 1,710$ g/ml: Plasmid-DNA aus NC22 (R323)

2.1.3 Dichtebestimmung der Plasmid-DNA aus UR323

Die DNA-Dichtebestimmung der aufbereiteten Plasmid-DNA des Stammes UR323 wurde im CsCl-Dichtegradienten in der analytischen UZ durchgeführt. Das Zentrifugationsergebnis ist in Abb. 11A (S. 43) dargestellt. Neben der Referenz-DNA ($\rho = 1.725 \text{ g/ml}$) ist nur noch ein Gipfel mit der Dichte 1.710 g/ml zu erkennen. Eine Heterogenität der Dichte ist mit dieser Methode nicht nachweisbar. Die unterschiedlich langen Plasmide der Längenklassen 1 und 2 haben anscheinend alle die gleiche oder zumindest eine sehr ähnliche Dichte von 1.710 g/ml , einem 51%-igen GC-Gehalt entsprechend.

2.2 Analyse des R323-Faktors in E. coli NC22

Durch Übertragung der Resistenzen von UR323 auf den plasmid-freien Stamm NC22 sollte es möglich sein im Rezipienten die Plasmid-DNA des R323-Faktors nachzuweisen.

2.2.1 Transfer der Resistenzgene von UR323 nach NC22

Der von Traub (1975) erwähnte Transfer der Resistenzen innerhalb E. coli wurde durch 2 unterschiedliche Konjugationsexperimente bestätigt.

a) Transfer des R323-Faktors auf Festmedium.

Bei der Kreuzung UR323 x NC22:nal-r erfolgte die Selektion für transferierte R-Faktoren auf Festmedium, durch Supplementation der Selektionsplatten mit Ampicillin, Kanamycin oder Tetracyclin.

Zur Gegenselektion wurde Nalidixinsäure verwandt. Es konnten von allen 3 Selektionsmedien resistente NC22-Kolonien isoliert werden. Sie wurden auf das Vorliegen der beiden anderen, nichtselektionierten Antibiotikaresistenzen geprüft. In Tab. 5 (S. 46) ist das Ergebnis dieses Versuchs enthalten. Außer den Transferfrequenzen bei unterschiedlicher Antibiotikaselektion ist auch das Ergebnis der Nachselektion aufgeführt. Das ebenfalls ermittelte Donor/Rezipienten-Verhältnis war bei dieser Kreuzung 40 : 1, zu erklären durch die unterschiedlichen Generationszeiten der beiden Stämme. Die Generationszeit von UR323 beträgt ca. 25 Minuten, die von NC22 50 Minuten.

b) Transfer des R323-Faktors in Flüssigmedium.

Analog der Festmediumkreuzung wurde der R-Faktor-Transfer von UR323 nach NC22 im Flüssigmedium untersucht. Es wurden die gleichen Selektionsbedingungen wie bei der vorhergehenden Kreuzung verwandt, die Selektion erfolgte jedoch nach unterschiedlich langer Konjugationsdauer. Die Konjugation wurde bis zu 60' in 15'-Abständen, von 60' bis 150' in 30'-Abständen unterbrochen. In Abb. 12 (S. 47) ist der Resistenztransfer als lg T resistenter Zellen in Abhängigkeit von der Konjugationszeit dargestellt. Es zeigt sich, daß die Transferkinetik unabhängig vom Selektionsmedium ist und für 3 Resistenzen fast synchron verläuft, vergleiche auch Tab. 5 (S. 46).

Selektions- medium PA + NaI	Kreuzung auf/in	Transferfrequenz	Anteil d. nachgetesteten Kolonien mit nichtselekt. Resistenz gegen			
			Amp	Kan	Tet	Anzahl d. Kolon.
+Amp	Fest- medium	2.6×10^{-5}	-	100%	100%	335
+Kan	"	2.65×10^{-5}	100%	-	100%	21
+Tet	"	NT +)	100%	100%	-	21
+Amp	Flüssig- medium	7.2×10^{-4}	-	100%	100%	252
+Kan	"	3.5×10^{-4}	100%	-	100%	50
+Tet	"	5.1×10^{-4}	100%	100%	-	50

+) NT: Wurde nicht getestet, es erfolgte nur eine qualitative Bestimmung

Tabelle 5: Quantitative Analyse des R323-Transfers von UF323 nach NC22.

Die Transferfrequenz dieser Kreuzungen ist in Abhängigkeit vom Selektionsmedium, nach unterschiedlichen Kreuzungsmethoden, dargestellt.

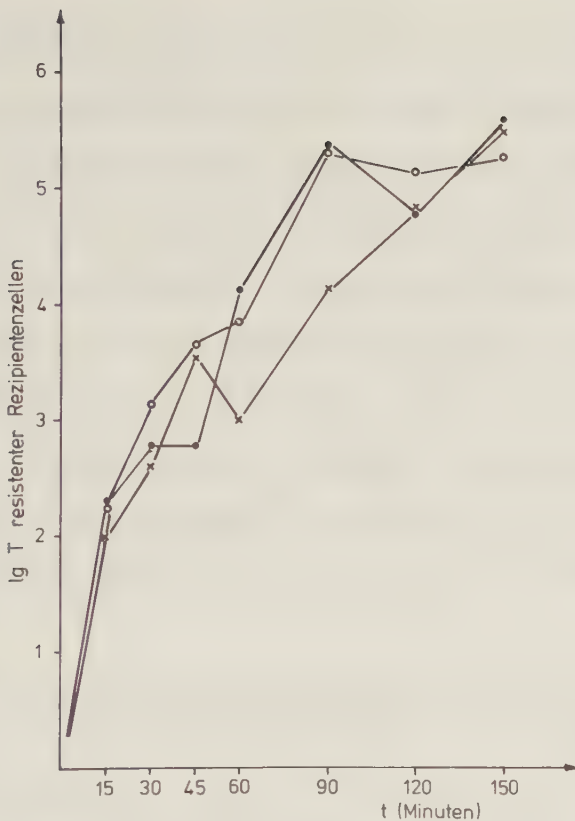


Abb. 12: R323-Transfer im Flüssigmedium von UR323 nach NC22. Die Transferkinetik ist als lg T resistenter Rezipientenzellen in Abhängigkeit von der Konjugationszeit aufgetragen.

- (●) Selektion für NC22 (R323) auf PA+Nal+Amp
- (o) Selektion für NC22 (R323) auf PA+Nal+Kan
- (x) Selektion für NC22 (R323) auf PA+Nal+Tet

Das Verhältnis Donor (UR323) zu Rezipient (NC22) war bei dieser Kreuzung 3 : 1. Die annähernd gleich hohe Transferwahrscheinlichkeit dreier verschiedener Resistenzmarkierungen, (amp-r, kan-r, tet-r), gepaart mit dem 100 %igen Ko-transfer nichtselektionierter Resistenzen, spricht für die Stabilität und die Einheitlichkeit des transferierten Resistenzfaktors. Zum Nachweis des gesamten R-Faktors wurde von je einer NC22 (R323)-Kolonie aus Amp-, Kan- und Tet-Selektion das Antibiotogramm (3) bestimmt. Tab. 3 (S. 38) zeigt die Antibiotogramme von NC22 vor und nach der Übertragung des R323 Faktors im Vergleich mit dem Donorstamm UR323. Bis auf Tripel-Sulfonamidresistenz konnte der Transfer der übrigen 10 Resistenzen nachgewiesen werden.

2.2.2 Nachweis und Isolierung von Plasmid-DNA aus NC22(R323)

Dieser Nachweis wurde bereits erbracht und im Ergebnisteil D.1.3 dokumentiert. Die Plasmidfraktion für die weiteren Untersuchungen wurde über CsCl-EthBr-Dichtegradientenzentrifugation isoliert.

2.2.3 Darstellung und Längenmessung der Plasmide aus NC22(R323)

Die Präparation der Plasmid-DNA aus NC22 (R323) zeigte bei der elektronenmikroskopischen Abbildung eine einheitliche Plasmidgröße.

Das in Abb. 13 (S. 42) dargestellte Plasmid gehört einer Längenklasse an, deren Mittelwert $32.2 \pm 2.0 \mu\text{m}$ beträgt. Das aus dieser Länge errechnete Molekulargewicht beträgt 67×10^6 amu. Die vollständigen Daten enthält Tab. 4 (S. 40). Die Längenverteilung der Plasmide aus NC22(R323) ist in Abb. 14 (S. 41) dargestellt. Im Vergleich mit der Längenverteilung der Plasmide aus UR323 (Abb. 9, S. 41) läßt sich erkennen, daß nur die Plasmide der Längenklasse 1 in beiden Stämmen vorhanden sind. Damit ist die Zuordnung der Resistenzen von R323 zu den Plasmiden der Längenklasse 1 gerechtfertigt. Die Funktion der Plasmide der Längenklasse 2 ($1.2 \mu\text{m}$), sowie die Eigenschaften der restlichen Plasmide mit unterschiedlicher Länge im Stamm UR323 wurden nicht weiter untersucht.

2.2.4 Dichtebestimmung der Plasmid-DNA aus NC22 (R323)

Dieses abschließende Experiment sollte einen weiteren Beweis für die Identität der großen Plasmide (Klasse 1) aus NC22 (R323) und UR323 liefern. Die Dichtebestimmung wurde analog jener für die Plasmide aus UR323 durchgeführt. Das Ergebnis wird in Abb. 11B (S. 43) gemeinsam mit dem Dichteprofil der Plasmide aus UR323 (Abb. 11A) gezeigt. Es ergab sich für beide Plasmidfraktionen die gleiche Dichte von $1,71 \text{ g/ml}$ im Vergleich zur Referenz DNA mit $\rho = 1,725 \text{ g/ml}$. Die unterschiedliche Gipfelhöhe resultierte aus unterschiedlichen Konzentrationen der Plasmid-DNA.

Die Heterogenität der Plasmidlängen bewirkt anscheinend keinen signifikanten Unterschied im Dichteprofil.

2.2.5 Interpretation der Ergebnisse

Die infektiöse Resistenz von R323 ist auf einem Plasmid von ca. 33 μ m kodiert. Die Dichte dieses Plasmids beträgt 1.71 g/ml in CsCl.

Die Funktion der 1.2 μ m langen Plasmide wurde nicht weiter untersucht. Es kann nur festgestellt werden, daß sie nicht gleichzeitig mit dem R-Faktor transferiert werden. Das gleiche trifft auch für die Eigenschaft H_2S -Produktion zu. Ob ein unmittelbarer Zusammenhang zwischen beiden Markierungen besteht, bleibt offen.

3. Charakterisierung des Resistenzfaktors R12644

Der E. coli-Stamm UR12644 wurde ähnlich wie UR323 aus der Urinprobe eines Patienten isoliert (43). Trotz der unabhängigen Isolierung zeigten beide Stämme fast identische Eigenschaften. So konnten für den Stamm UR12644 neben dem mit UR323 übereinstimmenden Resistenzspektrum (11 transferierbare Drogenresistenzen) auch H_2S -Produktion und Hämolyseaktivität nachgewiesen werden (43).

Den Experimenten zur molekularbiologischen Charakterisierung von R12644 wurde wiederum eine Überprüfung der wichtigen genetischen Markierungen des Ausgangstammes vorangestellt. Das Antibiotogramm (3) bestätigte das von Traub (1975) beschriebene Resistenzspektrum von UR12644. Der dafür verantwortliche Resistenzfaktor wurde in dieser Arbeit mit R12644 bezeichnet. Das Antibiotogramm von UR12644 ist in Tab. 8 (S. 60) dargestellt. Der H_2S -Nachweis verlief für UR12644 ebenso wie für UR323 positiv. Lediglich der Versuch zur Elimination von Resistenzgenen durch EthBr-Behandlung (Konzentration: 125 $\mu g/ml$) (42) ergab einen geringfügigen Unterschied zu dem von Traub (1975) gefundenen Resultat. Neben dem bereits bekannten (43) Verlust 7-facher Drogenresistenz, nämlich gegen Amp, Carb, Chlor, Ceph, Gm, Km, Nm, konnte in diesem Experiment der zusätzliche Resistenzverlust gegen Tobramycin nachgewiesen werden.

Unter 141 getesteten Kolonien war dies die einzige Mutante, die jedoch die Fähigkeit zur H_2S -Produktion noch behalten hatte.

Für die noch verbleibenden Resistenzeigenschaften dieses Stammes wurde ein R-Faktor (R12644-2) angenommen. Er zeigt Resistenz gegen Streptomycin, Tetracyclin und Tripel-Sulfonamide. Die Untersuchung von R12644-2 wird in Abschnitt D.3.3 beschrieben.

3.1 Plasmidanalyse des multiresistenten E. coli Stammes UP12044

3.1.1 Nachweis und Isolierung von Plasmiden aus UR12644

Es wurde bereits gezeigt (vgl. D.1.1. und D.1.2), daß der Stamm UR12644 Plasmid-DNA enthält. Die Isolierung erfolgte über CsCl-Dichtegradientenzentrifugation in Gegenwart von EthBr.

3.1.2 Darstellung und Längenmessung der Plasmide aus UR12644

Die Plasmid-DNA-Präparation des Stammes UR12644 zeigte im Elektronenmikroskop unterschiedlich große Plasmide. Die Längenverteilung dieser Plasmide ist in Abb. 15 (S.54) aufgezeichnet. Diese extrachromosomalen DNA-Ringe konnten 4 verschiedenen Längenklassen zugeordnet werden. In Tab.6(S.53) sind die Daten der quantitativen Auswertung enthalten. Daneben war jedoch eine Anzahl von Molekülen mit unterschiedlichen Längen in niedriger Kopienzahl vorhanden (vgl. Abb. 15).

Die elektronenmikroskopische Aufnahme eines Moleküls der Längenklasse 1 (vgl. Tab. 6) wird in Abb. 16(S. 55) gezeigt. Zusätzlich sind noch kleinere Plasmide dargestellt, die den restlichen Längenklassen angehören.

Stamm	Plasmid- klasse	Anzahl d. vermess. Moleküle	mittl. Länge +Standardab- weichung(μ m)	Molekular- gewicht amu x 10^6
UR12644	1	9	31.5 ± 1.0	65
	2	17	9.1 ± 0.6	19
	a	30	1.8 ± 0.08	3.7
	b	21	2.8 ± 0.16	5.8

Tabelle 6: Längenmessung von Plasmiden aus E. coli UR12644

3.1.3 Dichtebestimmung der Plasmid-DNA aus UR12644

Die Dichtemessung der Plasmid-DNA aus UR12644 zeigt Abb. 17 (S. 56).

Neben der Dichtereferenz erkennt man noch 3 weitere DNA-Banden mit folgenden Dichten:

1,710 g/ml

1.708 g/ml

1.700 g/ml

Diese unterschiedlichen DNA-Dichten lassen sich jedoch noch nicht mit den unterschiedlichen Plasmidgrößen der Klassen 1, 2, a, b in Verbindung bringen. Der Stamm UR12644 zeigt eine starke Differenzierung der physikalischen Plasmiddaten im Vergleich mit denen von UR323.

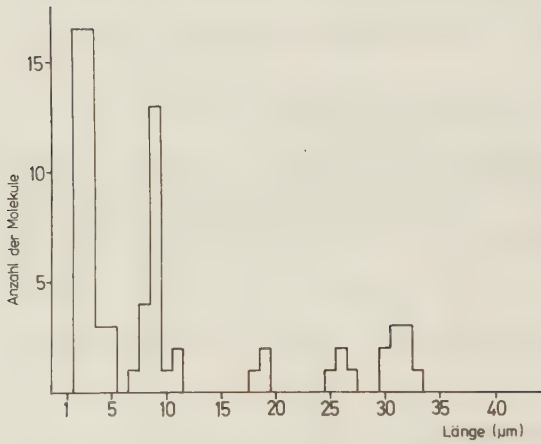


Abb. 15: Längenverteilung der Plasmide aus *E. coli* UR12644.

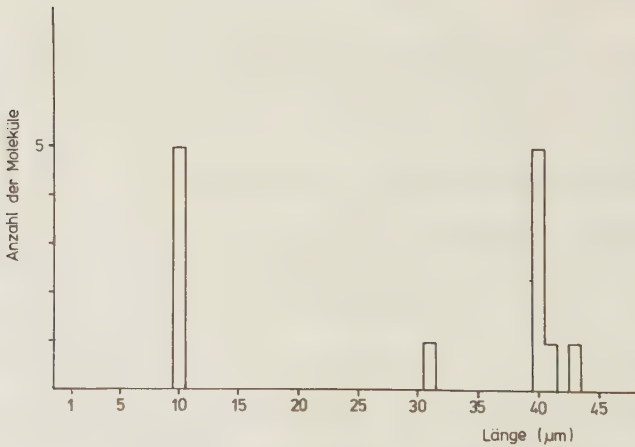


Abb. 19: Längenverteilung der Plasmide aus *E. coli* NC22 (R12644).

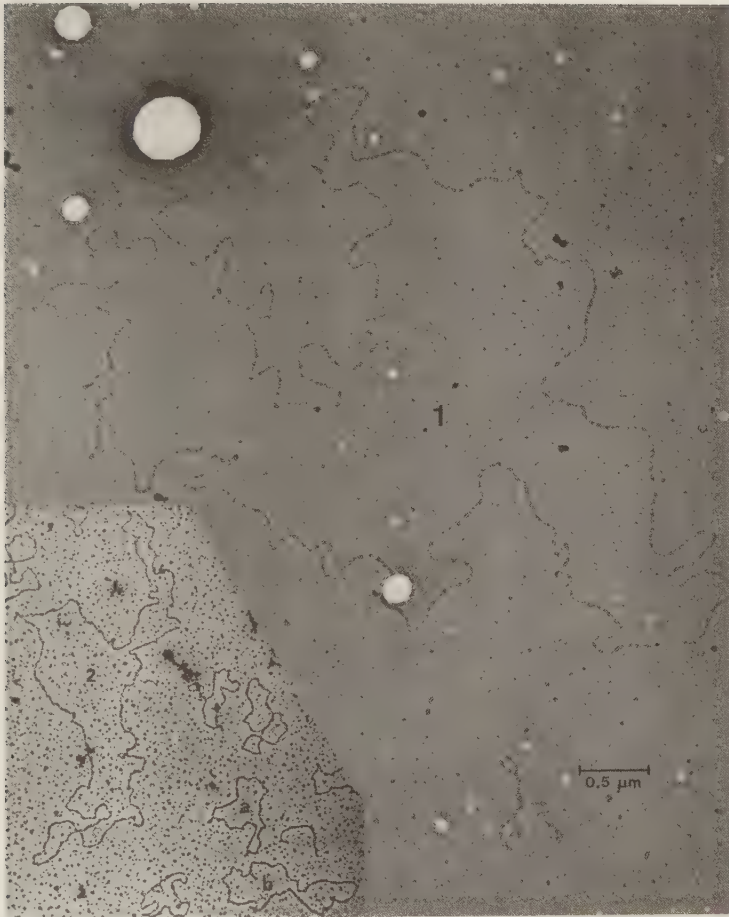


Abb. 16: Plasmid-DNA der Längenklassen 1 (31.5 μm);
2 (9.1 μm), a (1.8 μm), b (2.8 μm) aus
E. coli UR12644.
(Der Längenstandard gilt für beide Photos.)

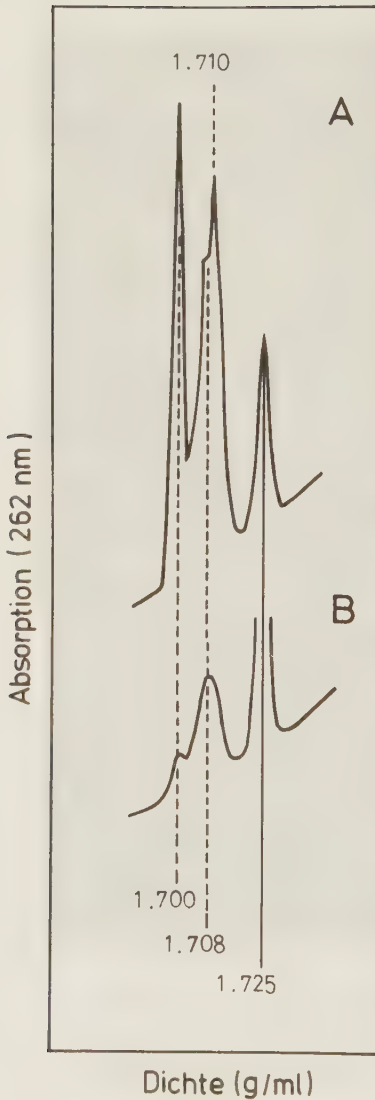


Abb. 17: DNA-Dichtebe-
stimmung durch CsCl-Dichte-
gradientenzentrifugation in
der analytischen UZ. Die
DNA-Bandierung wurde durch
Absorptionsmessungen bei
262 nm analysiert.

A) Dichteprofil der Plas-
mid-DNA des Stammes E.coli
UR12644

$\varrho = 1,725$ g/ml: Ref.DNA
(R.lupini)

$\varrho = 1,710$ g/ml: Plasmid-DNA
1,708 g/ml aus
1,700 g/ml UR12644

B) Dichteprofil der Plasmid-
DNA des Stammes E. coli
NC22 (R12644)

$\varrho = 1,725$ g/ml: Ref.DNA
(R. lupini)

$\varrho = 1,708$ g/ml: Plasmid-DNA
1,700 g/ml aus
NC22 (R12644)

3.2 Analyse des R12644-Faktors in E. coli NC22

3.2.1 Transfer der Resistenzgene von UR12644 nach NC22

Der Transfer der Resistenzgene von UR12644 nach F. coli und Klebsiella wurde bereits von Traub (1975) nachgewiesen. Um diesen R-Faktor identifizieren und charakterisieren zu können, wurde der Resistenztransfer nach F. coli NC22 untersucht. Diese Experimente wurden analog der Übertragung des F323-Faktors nach zwei unterschiedlichen Methoden durchgeführt.

a) R-Faktor-Transfer auf Festmedium

Bei der Kreuzung UR12644 x NC22 (nal-r) erfolgte die Selektion für NC22 (R12644) auf Festmedium. Die Gegen-selektion des Donors konnte mit Nalidixinsäure erfolgen. Für die R-Faktor-Übertragung auf NC22 wurde mit Amp, Kan oder Tet selektioniert. Die resistenten NC22-Kolonien wurden anschließend auf das Vorhandensein der beiden nichtselektionierten Resistenzen getestet. Die Errechnung der Transferfrequenz erfolgte über die Lebendtitrierung des Donor-Rezipientengemischs, zum Zeitpunkt der Selektion. Das Verhältnis Donor / Rezipient wurde dabei über die nal-r Markierung des Rezipienten ermittelt. Die quantitative Auswertung dieser Kreuzung ist in Tab. 7 (S. (1)) zusammengefaßt. Die Berechnung der Transferfrequenz stützt sich dabei auf ein Verhältnis von Donor zu Rezipient gleich 25 : 1.

b) R-Faktor-Transfer im Flüssigmedium

Der Donor- und Rezipientenstamm, sowie die Selektionsbedingungen wurden analog der Festmedienkreuzung verwendet. Im Unterschied zur vorhergehenden Kreuzungsmethode wurde die Konjugation durch gemeinsame Anzucht der Kreuzungspartner in PA-flüssig erlaubt. Durch unterschiedliche zeitliche Begrenzung der Konjugation konnte die Kinetik des R-Faktor-Transfers in Abhängigkeit vom Selektionsmedium studiert werden.

Durch die Sekundärselektion wurde auf die Übertragung nichtselektionierter Antibiotikaresistenzen getestet. Die Hilfsmessungen zur Bestimmung der Transferfrequenz wurden entsprechend der vorher beschriebenen Kreuzung durchgeführt.

Ergebnis: Die Kinetik des R-Faktor -Transfers ist in Abb.18 (S.62) aufgezeichnet. Dabei wurde log des Titors resistenter Rezipientenzellen (in Abhängigkeit vom Selektionsmedium) gegen die Konjugationszeit aufgetragen. Die entsprechenden Transferfrequenzen und das Ergebnis der Nachselektion sind Tab. 7(S.61) zu entnehmen. Das signifikanteste Resultat des R12644-Transfers nach NC22 war die Identifikation eines neuen Phänotyps. Alle Kolonien der Primärselektion auf Kan- oder Tet-haltigem Medium zeigten bei der Nachselektion auch die beiden anderen, primär nicht selektionierten Resistenzen. Dies spricht für eine vollständige Übertragung von R12644. Jedoch nur 70% der Kolonien aus der Ampicillinselektion zeigten damit vergleichbare Eigenschaften.

Die restlichen 30 % der primär selektionierten amp-r Kolonien erwiesen sich beim Nachtesten als kan-s und tet-s. Dabei war diese Aufspaltung in sehr viel größerem Ausmaß nach Kreuzung auf Festmedium als nach Konjugation im Flüssigmedium zu beobachten.

Dieses vorerst als amp-r aber kan-s und tet-s identifizierte Derivat des R12644 Faktors erhielt die Bezeichnung R12644-1. Die ausführliche Charakterisierung von R12644-1 wird unter D.3.4 geschildert. Das ganze Ausmaß der Reduktion des Resistenzspektrums von R12644-1 wurde durch das entsprechende Antibiotogramm erkannt (Tab. 8, S. 60).

Droge Stamm	Amp	Carb	Ceph	Chlor	Gm	Km	Na	Nm	Nitr	PB	Sm	Tc	Tob	SSS	SxT
NC22	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	R	R
NC22 (R12644)	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R
NC22 (R12644-1)	R	R	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	R	R
UR12644	R	R	R	P	R	R	S	P	S	S	R	R	R	R	S

Tabelle 8: Antibiogramme verschiedener E. coli Stämme mit und ohne den Resistenzfaktor

R12644 bzw. R12644-1. Die verwendeter Abkürzungen sind im Methodenteil C.11 erklärt.

R = resistent
S = sensitiv

Anmerkung: Nach diesem Vergleich ist nur die SSS-Resistenz nicht eindeutig zuzuordnen, da sie sowohl plasmidkodiert auf dem R12644 vorliegt, aber auch eine chromosomal determinierte Eigenschaft von E. coli NC22 darstellt. Später kann jedoch noch gezeigt werden (vgl. D.3.4.5), daß z.B. nur die Resistenzen gegen Amp, Carb und Ceph R12644-1-spezifische Eigenschaften sind

Selektions- medium PA + NaI	Kreuzung auf/in	Transferfrequenz	Anteil der nachgetesteten Kolonien mit nichtselektionierter Resistenz gegen			
			Amp	Kan	Tet	Anzahl d. Kolonien
+Amp +Kan +Tet	Fest- medium	1.4×10^{-4}	-	70%	70%	208
	"	6.4×10^{-5}	100%	-	100%	21
	"	NT +)	100%	100%	-	21
+Amp +Kan +Tet	Flüssig- medium	2.9×10^{-4}	-	99%	99%	225
	"	3.5×10^{-4}	100%	-	100%	50
	"	1.2×10^{-4}	100%	100%	-	50

+) NT: Wurde nicht getestet, es erfolgte nur eine qualitative Bestimmung.

Tabelle 7: Quantitative Analyse des R12644-Transfers von UR12644 nach NC22.

Die Transferfrequenz dieser Kreuzung ist in Abhängigkeit vom Selektionsmedium nach unterschiedlichen Kreuzungsmethoden dargestellt.

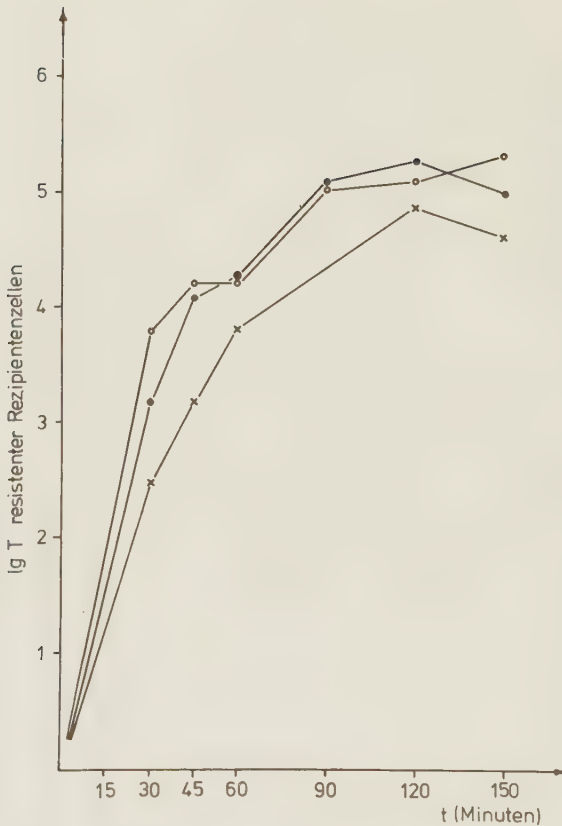


Abb. 18: R12644-Transfer im Flüssigmedium von UR12644 nach NC22. Die Transferkinetik ist als lg T resistenter Rezipientenzellen in Abhängigkeit von der Konjugationszeit aufgetragen.

(●) Selektion für NC22(R12644) auf PA+Nal+Amp

(o) Selektion für NC22(R12644) auf PA+Nal+Kan

(x) Selektion für NC22(R12644) auf PA+Nal+Tet

3.2.2 Nachweis und Isolierung von Plasmid-DNA aus NC22(R12644)

Ein Stamm, NC22(R12644), der das gesamte Resistenzspektrum des R12644-Faktors ausprägt, wurde für den Nachweis und die Isolierung von Plasmid-DNA ausgewählt. Die dabei angewandte Methode war CsCl-EthBr-Dichtegradientenzentrifugation.

Ergebnis: Es konnte eine Plasmidbande identifiziert werden, die nach dem unter D.1.4 beschriebenen Verfahren isoliert wurde.

3.2.3 Darstellung und Längenmessung der Plasmide aus NC22(R12644)

Die elektronenmikroskopische Darstellung der Plasmide und deren Längenmessung führte zu einem überraschenden Ergebnis. Wie aus Abb. 19 (S. 54) ersichtlich ist treten 3 Plasmidgrößen auf, von denen 2 den Längenklassen 1 und 2 (30.7 μm ; 10 μm) aus UP12644 zuzuordnen sind. Für die größten Moleküle dieser DNA-Fraktion wurde die Längensklasse 3 (40.6 μm) eingeführt. In Tab.9 (S. 64) sind die Meßergebnisse enthalten. Ein Plasmid der neuentdeckten Größenklasse 3 ist in Abb. 20 (S. 65) dargestellt.

Kleine Plasmide, entsprechend den Klassen a und b bei UR12644, waren in NC22 (R12644) nicht mehr nachzuweisen. Das mit 30,7 μm vermessene Plasmid paßt gut in die bei UR12644 eingeführte Plasmidklasse 1. Die Moleküle mit der mittleren Länge von 10 μm wurden der Plasmidklasse 2 zugeordnet. Die 10 %-ige Längendifferenz dieser Plasmide (Größenklasse 2) aus UR12644 und NC22 (R12644) kann noch nicht erklärt werden. Zwischen einem tatsächlichen materiellen Zuwachs von 10 % und einer artifiziellen Molekülvergrößerung konnte nicht entschieden werden. Zur besseren statistischen Absicherung wäre eine größere Anzahl von Einzelmessungen notwendig.

Stamm	Plasmid- klasse	Anzahl d. vermess. Moleküle	mittl. Länge +Standardab- weichung (μm)	Molekular- gewicht $\text{amu} \times 10^6$
NC22- (R12644)	1	1	30.7	64
	2	5	10.9 $\pm$ 0.25	21
	3	7	40.6 $\pm$ 1.3	84

Tabelle 9: Längenmessung von Plasmiden aus E. coli
NC22 (R12644)

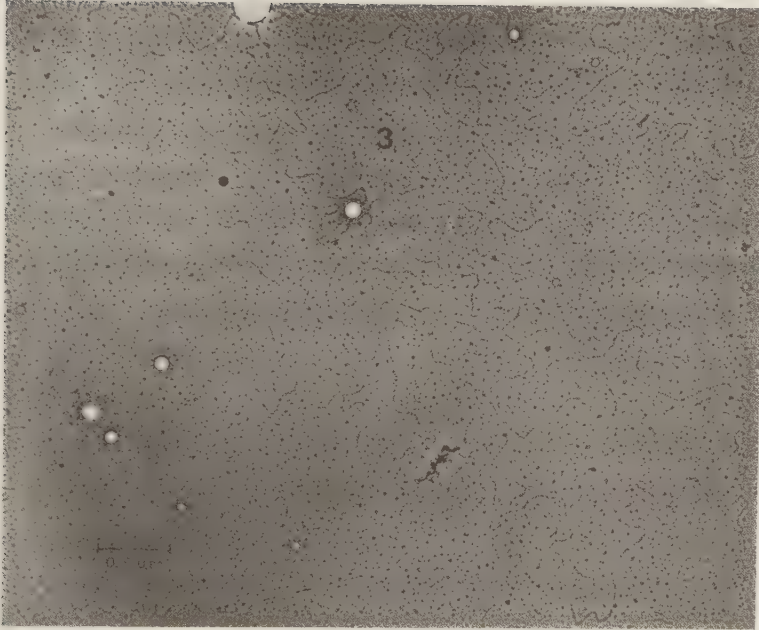


Abb. 20: Plasmid-DNA der Längenkategorie 3 ($40,6 \pm 1,3 \mu\text{m}$)
aus *E. coli* NC22(R12644).

3.2.4 Dichtebestimmung der Plasmid-DNA aus NC22(R12644)

Der Dichtebestimmung der Plasmid-DNA des Stammes NC22(R12644) kommt im Vergleich mit dem Dichteprofil der Plasmid-DNA des Ausgangsstammes (UR12644) eine besondere Bedeutung zu. Erstens waren die kleinen Plasmide a und b nicht mehr in dieser Plasmidfraktion, zweitens konnte ein neues Plasmid mit ca. 41 μ m Länge identifiziert werden. Die CsCl-Dichtegradientenzentrifugation in der analytischen UZ ergab das in Abb. 17B (S. 56) gezeichnete Dichteprofil für die Plasmid-DNA aus NC22(R12644). Es sind 2 Banden zu erkennen, wobei dem kleinen Gipfel die Dichte 1.700 g/ml dem großen die Dichte 1.708 g/ml zukommt. Beide DNA-Dichten sind im Dichteprofil der Plasmid-DNA des Stammes UR12644 enthalten (vgl. Abb. 17A, S. 56).

3.2.5 Arbeitshypothese

Die Längen- und Dichtemessung der extrachromosomalen DNA aus UR12644 und NC22(R12644) ergab noch nicht die entsprechende Korrelation zwischen Plasmid-DNA und -Funktion, wie für R323. Die bisherigen Ergebnisse zur R12644-Charakterisierung wurden folgendermaßen interpretiert:

a) Entstehung der Plasmide der Längensklasse 3

Die in NC22(R12644) vorgefundenen Plasmide mit 40.6 μm Länge (Längensklasse 3) sind aus Plasmiden der Längensklassen 1 und 2 im Stamm UR12644 durch Integration entstanden. (Die Längenaddition von 9.1 μm und 31.6 μm ergibt den entsprechenden Größenbereich von 41 μm).

Durch die Ankopplung einer Multiresistenzdeterminante (r) an einen Resistenztransferfaktor (RTF) wird die Mobilisierung der Resistenzgene ermöglicht. Die Existenz der 10 μm - und 31 μm -Plasmide in NC22(R12644) ist ein Indiz für die Reversibilität des Integrationsprozesses.

b) Korrelation Plasmidklasse - Plasmiddichte

Die Hauptmasse der Plasmid-DNA aus NC22(R12644), nämlich die kointegrierten 41 μm -Plasmide, sind der Hauptbande der Dichtebestimmung mit 1.708 g/ml zuzuordnen.

Die nächsthäufigste DNA-Spezies dieser Plasmidfraktion, das 10 μm -Plasmid, wird dem kleineren Gipfel des Profils mit einer Dichte von 1.700 g/ml zugeordnet.

Die Plasmide der Klasse 1 ($31.5 \mu\text{m}$) sind bei der Dichtebestimmung Abb. 17E, S. 56) in einer nicht nachweisbar geringen Konzentration vorhanden, müßten aber bei einer Dichte von 1.710 g/ml bandieren. Die prominenten Dichtebanden bei 1.700 g/ml und 1.710 g/ml im Dichteprofil der Plasmid-DNA aus UR12644 zeigen den desintegrierten Zustand des P12644 mit separierten Plasmiden der Klassen 1 und 2. Die Dichteschulter bei 1.708 g/ml entspricht dem bereits zum Transfer-kointegrierten R12644-Faktor mit einer Länge von $40.6 \mu\text{m}$. (Elektronenmikroskopisch konnte dieses Plasmid aus UR12644 mit den durchgeführten Messungen nicht nachgewiesen werden.)

Zur Bestätigung dieser Hypothese ist es notwendig, zumindest einem der an der Fusion beteiligten DNA-Moleküle ($9.1 \mu\text{m}$; $31.5 \mu\text{m}$) eine entsprechende Dichte und eine entsprechende Funktion zuzuordnen. Dieser Nachweis sollte unter anderem über die Charakterisierung der R12644-Derivate, R12644-1 und P12644-2, geführt werden.

3.3 Analyse des R12644-2-Faktors

Dieser durch EthBr-Behandlung von E. coli UR12644 entstandene Abkömmling des R12644-Faktors (vgl. D.3) kodiert nur noch Resistenzen gegen Streptomycin, Tripel-Sulfonamide und Tetracyclin. Die Verkürzung eines der in UR12644 gefundenen Plasmide würde die Resistenzdeterminante von R12644 markieren.

3.3.1 Nachweis und Isolierung von Plasmid-DNA aus UR12644-2

Dazu wurde der Stamm UR12644-2 nach der Sarkosylmethode lysiert und die DNA im CsCl-Dichtegradienten in Gegenwart von EthBr bandiert.

Ergebnis: Es wurde wiederum eine Plasmidbande identifiziert und nach der unter D.1.4 beschriebenen Methode isoliert. Diese DNA-Fraktion wurde für die weiteren Untersuchungen verwendet.

3.3.2 Darstellung und Längenmessung der Plasmide aus UR12644-2

Die Vermessung der im Elektronenmikroskop dargestellten und photographierten Plasmide ergab die in Abb. 21A (S. 71) aufgezeichnete Längenverteilung der Plasmid-DNA. Dieses Histogramm ist mit dem der Plasmid-DNA-Längenverteilung aus UR12644 im Bereich zwischen 0 und 15 μm vergleichbar (siehe Abb. 15, S. 54). Plasmide mit einer Länge von $>$ maximal 15 μm konnten nicht mehr nachgewiesen werden. Die im Bereich bis 15 μm erkannten Plasmidklassen, mit den entsprechenden Längen, Standardabweichungen und

Molekulargewichten, sind Tab. 10 (S. 70) zu entnehmen. Die Plasmidklassen 2, a, b stimmen mit den entsprechenden Plasmidklassen aus UR12644 überein (vgl. Tab. 6, S. 53). Es trat jedoch keine neue Plasmidgröße auf, die eine um acht Resistenzen verkürzte, ringförmige DNA darstellen würde.

Stamm	Plasmid- längen- klasse	Anzahl d. vermess. Moleküle	mittl. Länge +Standardab- weichung(μ m)	Molekular- gewicht amu x 10 ⁶
UR12644-2	2	40	9.4 $\pm$ 0.5	19.5
"	a	52	1.8 $\pm$ 0.18	3.7
"	b	43	2.8 $\pm$ 0.22	5.8

Tabelle 10: Längenmessung der Plasmide aus E. coli
UR12644-2

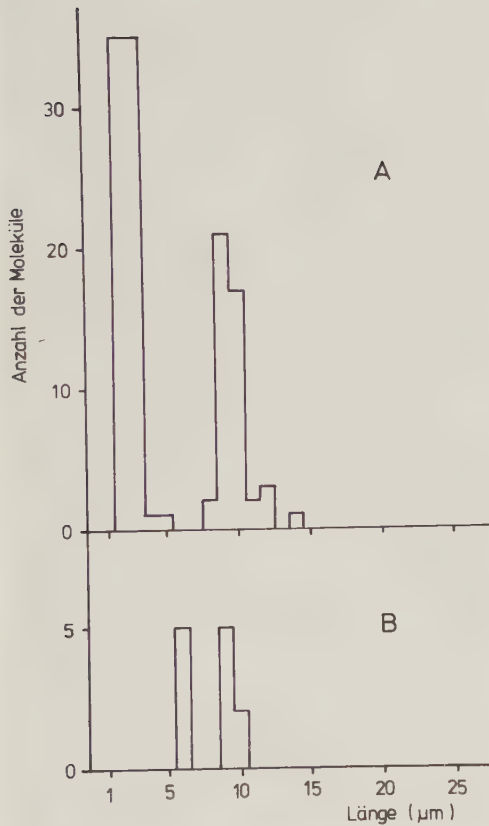


Abb. 21: Längenverteilung von Plasmiden
aus *E. coli* Stämmen mit R12644-2

A) Plasmide aus UR12644-2

B) Plasmide aus NC22 (R12644-2)



Abb. 23: Plasmid-DNA der Lönrenklassen 2 ($9,6 \pm 0,32 \mu\text{m}$)
und 5 ($6,2 \pm 0,35 \mu\text{m}$) aus *E. coli* NC22 (R12644-2)

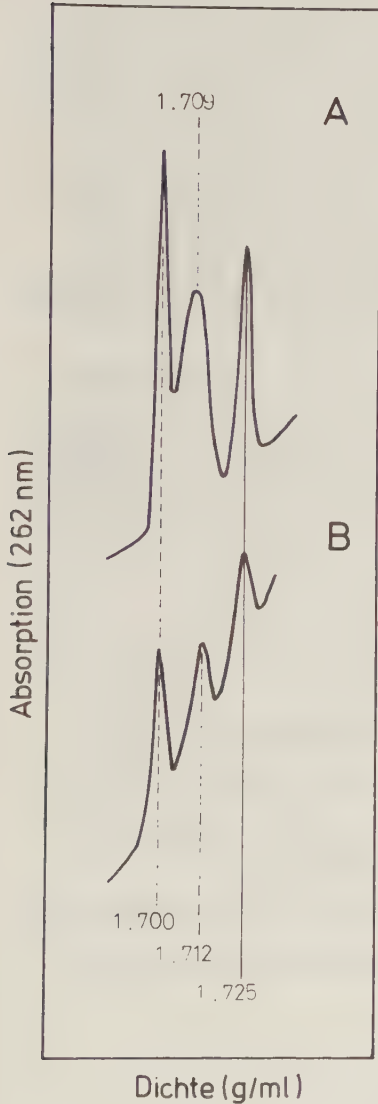


Abb. 22: DNA-Dichtebestimmung durch CsCl-Dichtegradientenzentrifugation in der analytischen UZ. Die DNA-Bandierung wurde durch Absorptionsmessungen bei 262 nm analysiert.

A) Dichteprofil der Plasmid-DNA des E. coli Stammes UR12644-2

$\varrho = 1,725$ g/ml: Ref.DNA
(R. lupini)

$\varrho = 1,709$ g/ml: Plasmid-DNA
1,700 g/ml aus
UR12644-2

B) Dichteprofil der Plasmid-DNA des Stammes E. coli NC22 (R12644-2)

$\varrho = 1,725$ g/ml: Ref. DNA
(R. lupini)

$\varrho = 1,712$ g/ml: Plasmid-DNA
1,700 g/ml aus
NC22 (R12644-2)

3.3.3 Dichtebestimmung der Plasmid-DNA aus UR12644-2

Die Dichtebestimmung der Plasmid-DNA aus UR12644-2, durch CsCl-Dichtegradientenzentrifugation in der analytischen UZ, ergab das in Abb.22A(S.73) dargestellte DNA-Dichteprofil. Für die relativ scharfe Bande wurde eine Dichte von 1,700 g/ml berechnet. Der breiteren Bande dieses Profils kommt eine Dichte von 1,709 g/ml zu. Im Vergleich mit dem Plasmiddichteprofil des UR12644-Ausgangsstammes (Abb.17A, Seite 56) zeigt sich, daß die scharfe Bandierung im Dichtebereich 1,71 bzw. 1,708 g/ml nicht mehr vorhanden ist.

3.3.4 Transfer der Resistenzgene von UR12644-2 nach NC22

Dieser Resistenztransfer wurde wiederum nach 2 verschiedenen Methoden untersucht.

a) R-Faktor-Transfer auf Festmedium

R-Faktor-Donor: E. coli UR12644-2

R-Faktor-Rezipient: E. coli NC22 nal-r

Die Selektion für NC22 (R12644-2)-Kolonien wurde auf PA + Nal + Tet-Platten durchgeführt. Das Ergebnis dieser Kreuzung kann Tab. 11(S.75) entnommen werden.

b) R-Faktor-Transfer im Flüssigmedium

Die Kreuzungspartner wurden gleich der Festmediumkreuzung gewählt. Die Selektionsbedingungen waren ebenfalls identisch.

Die Unterbrechung der Konjugation erfolgte in 15'-

Abständen bis zu einer Gesamtzeit von 105'.

Nur über die Kreuzung auf Festmedium war der Transfer der tet-Resistenz auf NC22 mit einer niedrigen Transferfrequenz von 6.3×10^{-7} (Tab. 11, S.75) nachzuweisen.

Einige der NC22-Kolonien wurden auf das Vorliegen der beiden weiteren Resistenzen (str-r, sss-r) des R12644-2 getestet. Das Antibiotogramm bestätigte die vollständige Übertragung der R12644-2-Resistenzen.

Selektions- medium PA + Nal	Kreuzung auf/in	Donor Rezipient	Transferfrequenz
+Tet	Fest- medium	3 : 1	6.3×10^{-7}
+Tet	Flüssig- medium	NT ⁺⁾	0

⁺⁾ NT: Nicht getestet

Tabelle 11: Quantitative Analyse des R12644-2-Transfers von UR12644-2 nach NC22.

3.3.5 Transformation von E. coli MB101 mit Plasmid-DNA aus UR12644-2

Die bei der Konjugation gezeigte, minimale Transferwahrscheinlichkeit der R12644-2-kodierten Resistenzen könnte durch das Vorliegen einer nicht mehr mobilisierbaren, extrachromosomalen Resistenzdeterminante erklärt werden. Diese Annahme wurde durch ein DNA-Transformationsexperiment nachgeprüft. Dazu wurde die Methode nach Cohen (1972) verwendet. Die Plasmid-DNA wurde aus E. coli UR12644-2 isoliert. Die Aufbereitung der DNA erfolgte durch EthBr-Extraktion und anschließende Dialyse gegen TEN-Puffer. Bei dem Transformationsexperiment wurden ca. 25 µg Plasmid-DNA mit 10^8 Pezipientenzellen des E.coli-Stammes MB101 getestet. Die Selektion transformierter Kolonien erfolgte auf PA + Tet-Platten.

Ergebnis: Es konnte keine einzige tet-r MB101-Kolonie gefunden werden. Unzulänglichkeiten des Transformationsystems konnten ausgeschlossen werden, da eine parallel durchgeführte Transformation mit einer anderen Plasmidspezies erfolgreich verlief (siehe D.3.4.5). Dieser Befund spricht dafür, daß R12644-2 im UR-Stamm nicht als Plasmid vorliegt.

3.3.6 Nachweis und Isolierung von Plasmid-DNA aus

NC22(R12644-2)

Ein durch Konjugation entstandener Stamm, NC22(R12644-2), wurde einer Plasmidanalyse unterzogen. Die präparative CsCl-Dichtegradientenzentrifugation in Gegenwart von EthBr bewies das Vorliegen von ccc-DNA in diesem Bakterienstamm. Die isolierten Plasmide wurden zur elektronenmikroskopischen Darstellung und zur Dichtebestimmung weiterverwendet.

3.3.7 Darstellung und Längenmessung der Plasmide aus

NC22(R12644-2)

Die elektronenmikroskopische Darstellung der Plasmide aus NC22(R12644-2) wird an einem Beispiel in Abb. 23 (S. 72) gezeigt. Die quantitative Auswertung ist als Histogramm in Abb. 21B (S. 71) dargestellt. Die entsprechenden Plasmiddaten sind Tab. 12 (S. 78) zu entnehmen. Von den im kurlierten Ausgangsstamm (UR12644-2) vorhandenen Plasmiden waren nur noch die Plasmide der Klasse 2 übereinstimmend nachzuweisen. So wurden auch die kleinen Plasmide der Längensklassen a und b ($1.8 \mu\text{m}$ und $2.8 \mu\text{m}$) nicht gefunden. Dagegen konnten Plasmide mit einer mittleren Länge von $6.2 \mu\text{m}$ als neue Plasmidklasse identifiziert werden. Es wurde versucht, diese Plasmide auch über die Dichtebestimmung zu charakterisieren.

Stamm	Plasmid- klasse	Anzahl d. vermess. Moleküle	mittl. Länge +Standardab- weichung(μm)	Molekular- gewicht $\text{amu} \times 10^6$
NC22 (R12644-2)	2	7	9.6 ± 0.32	20
" "	5	5	6.2 ± 0.35	13

Tabelle 12: Längenmessung der Plasmide aus E. coli
NC22 (12644-2).

3.3.8 Dichtebestimmung der Plasmid-DNA aus NC22(R12644-2)

Die Dichtemessung der Plasmid-DNA des Stammes NC22(R12644-2) in der analytischen UZ lieferte die in Abb. 22B (S. 73) gezeigte DNA-Verteilung. Die zusätzlich zur Referenz-DNA identifizierten Banden lagen bei Dichten von 1.700 g/ml und 1.712 g/ml. Unter Einbeziehung der Längenmessung der Plasmid-DNA aus beiden Stämmen kann man den Plasmiden der Längensklasse 2 (9-10 μm) eine Dichte von 1.700 g/ml zuordnen. Den Plasmiden mit 6.2 μm Länge kommt die Dichte 1.712 g/ml zu.

3.4 Analyse des R12644-1-Faktors

Das R12644-1-Derivat des ursprünglichen R-Faktors wurde bei der Konjugation von UR12644 und NC22 entdeckt (D.3.2.1). Die dabei entstandenen NC22 (R12644-1)-Zellen zeigten nur noch Resistenz gegen Ampicillin, Carbenicillin und Cephalothin. Die Charakterisierung der molekularen und genetischen Eigenschaften sollte einen wesentlichen Beitrag zur Analyse von R12644 leisten.

3.4.1 Nachweis und Isolierung von Plasmid-DNA aus NC22 (R12644-1)

Die CsCl-EtBr-Dichtegradientenzentrifugation zeigte für den Stamm NC22 (R12644-1) eine schwache Plasmidbande an (vgl. D.1.1). Diese Plasmide wurden zur weiteren molekularbiologischen Charakterisierung isoliert.

3.4.2 Darstellung und Längenmessung der Plasmide aus NC22 (R12644-1)

Die Längenmessung der elektronenoptisch dargestellten Plasmide (Abb. 24, S. 81) ergab die in Abb. 25A (S. 82) gezeigte Längenverteilung. Die entsprechenden mittleren Längen mit Standardabweichung und Molekulargewicht sowie eine Klasseneinteilung der Plasmide sind Tab. 13, S. 80 zu entnehmen.

Stamm	Plasmid- klasse	Anzahl d. vermess. Moleküle	mittl. Länge +Standardab- weichung(μm)	Molekular- gewicht $\text{amu} \times 10^6$
NC22- (R12644-1)	2	11	9.1 ± 0.36	19
	4	6	4.2 ± 0.35	9
MB101- (R12644-1)	4	11	4.4 ± 0.13	9

Tabelle 13: Längenmessung der Plasmide aus NC22 (R12644-1)
und MB101 (R12644-1).

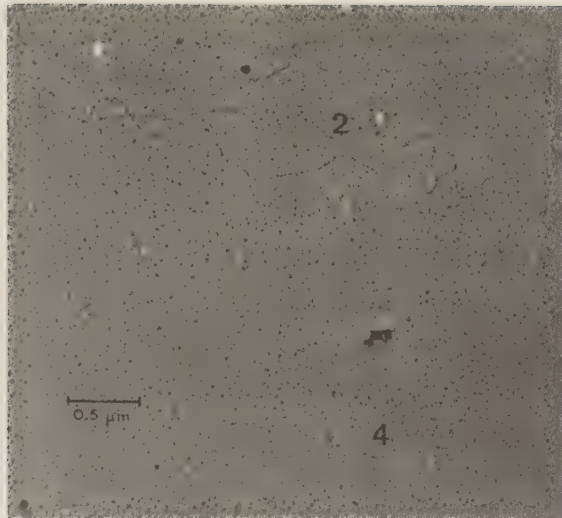


Abb. 24: Plasmid-DNA der Längenklassen 2 ($9,1 \pm 0,36 \mu\text{m}$)
und 4 ($4,2 \pm 0,35 \mu\text{m}$) aus *E. coli* NC22 (R12644-1)

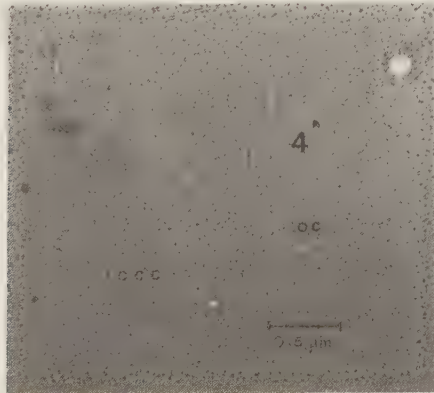


Abb. 28: Plasmid-DNA der Längensklasse 4 ($4,4 \pm 0,13 \mu\text{m}$)
in der oc-(open circular) und ccc-Form, aus
E. coli MB101 (R12644-1)

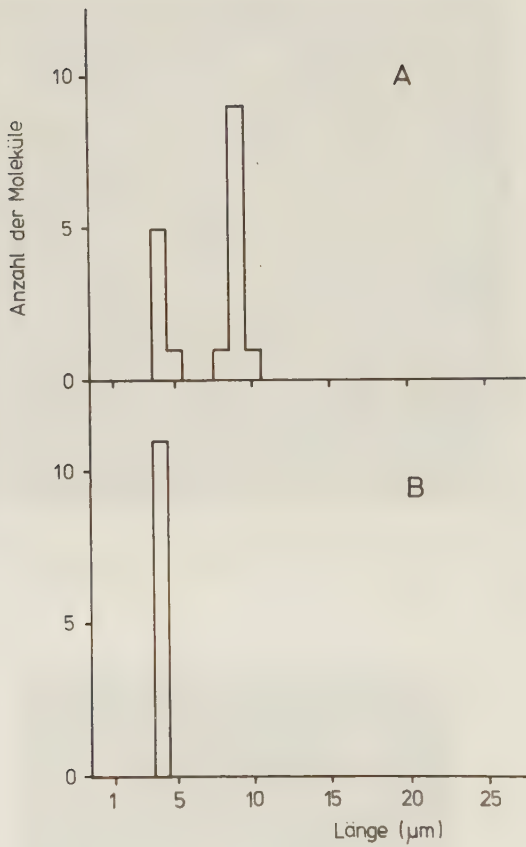


Abb. 25: Längenverteilung von Plasmiden aus *E. coli*-
Stämmen mit R12644-1

A) Plasmide aus NC22 (R12644-1)

B) Plasmide aus MB101 (R12644-1)

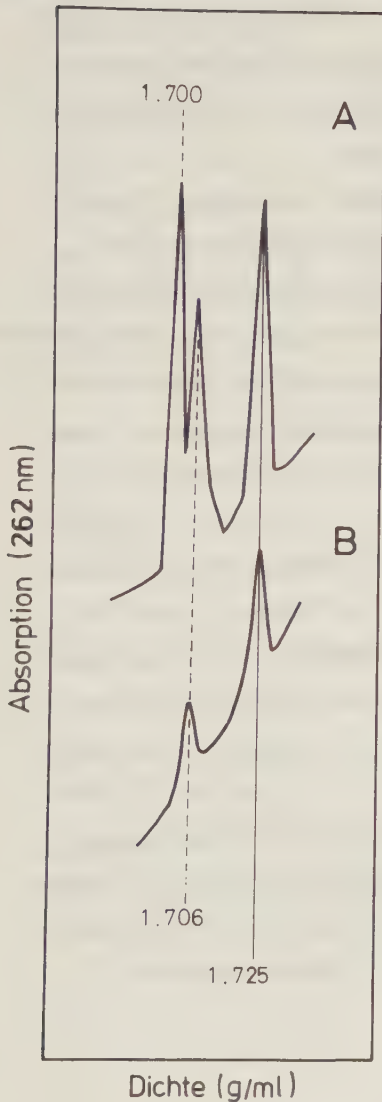


Abb. 26: DNA-Dichtebestimmung durch CsCl-Dichtegradientenzentrifugation in der analytischen UZ. Die DNA-Bandierung wurde durch Absorptionsmessungen bei 262 nm analysiert.

A) Dichteprofil der Plasmid-DNA des *E. coli* Stammes NC22 (R12644-1)

$\varrho = 1,725$ g/ml: Ref.DNA
(*E. lupin*1)

$\varrho = 1,706$ g/ml: Plasmid-DNA
1,700 g/ml aus
NC22 (R12644-1)

B) Dichteprofil der Plasmid-DNA des *E. coli* Stammes MB101 (R12644-1)

$\varrho = 1,725$ g/ml: Ref.DNA
(*E. lupin*1)

$\varrho = 1,706$ g/ml: Plasmid-DNA
aus
MB101 (R12644-1)

3.4.3 Dichtebestimmung der Plasmid-DNA aus NC22 (R12644-1)

Die Dichtebestimmung der NC22 (R12644-1)-Plasmide wurde im CsCl-Gradienten in der analytischen UZ durchgeführt. Aus dem DNA-Profil wurden folgende Dichten berechnet:

1,700 g/ml

1,706 g/ml (siehe Abb. 26 A, S. 83)

Die bisherigen Ergebnisse zur Charakterisierung der Moleküle aus NC22(R12644-1) zeigen eine auffallende Ähnlichkeit zu denen für NC22(R12644-2). Beide Derivate bestehen in NC22 aus je 2 Plasmiden, wobei jeweils eines dieser Moleküle der Klasse 2 (9 -10 μ m) angehört. Das zweite Plasmid eines jeden Derivats ist mit 4,2 μ m bzw. 6,2 μ m jeweils kleiner.

Außerdem zeigt die DNA-Dichtebestimmung beider Plasmidfraktionen Übereinstimmung bei 1.700 g/ml.

Ordnet man diese Dichte den Plasmiden der Klasse 2 zu, so ergibt sich für das 6,2 μ m Plasmid eine Dichte von 1,712 g/ml und für das 4,2 μ m Plasmid eine Dichte von 1,706 g/ml.

In Anlehnung an die in Punkt D.3.2.5 aufgestellte Arbeitshypothese sollte es jetzt möglich sein, über Transfer- und Transformationsexperimente der physikalischen Plasmidcharakterisierung eine Funktion zuzuordnen.

3.4.4 Transfer der Resistenzgene von NC22 (R12644-1)
nach E. coli K12-1

a) R-Faktor-Transfer auf Festmedium

R-Faktor-Donor: NC22 (R12644-1): str-s, amp-r

R-Faktor-Rezipient: K12-1: str-r, amp-s,

Selektionsmedium für E. coli K12-1 (R12644-1): PA + Str +

Amp. Hilfsmessungen zur Bestimmung der Transferfrequenz:

- Lebendtiter-Bestimmung des Kreuzungsgemischs zum Zeitpunkt der Selektion.

- Bestimmung des Donor- und Rezipientenanteils zum Zeitpunkt der Selektion. (Test durch Überstempeln der Titerbestimmungsplatten auf PA + Str.)

Ergebnis: Das Donor/Rezipientenverhältnis war 1 : 2,5, die Transferfrequenz für R12644-1 betrug 10^{-2} .

b) R-Faktor-Transfer im Flüssigmedium

Kreuzungspartner und Selektionsmedium wurden analog der Festmedienkreuzung verwendet. Die Unterbrechung der Konjugation erfolgte in 15'-Abständen bis zu einer Gesamtzeit von 105'.

Ergebnis: Die Transferkinetik dieser R-Faktor-Übertragung ist in Abb. 27 (S. 86) dargestellt.

Beide Kreuzungen ergaben einen hohen R-Faktor-Transfer.

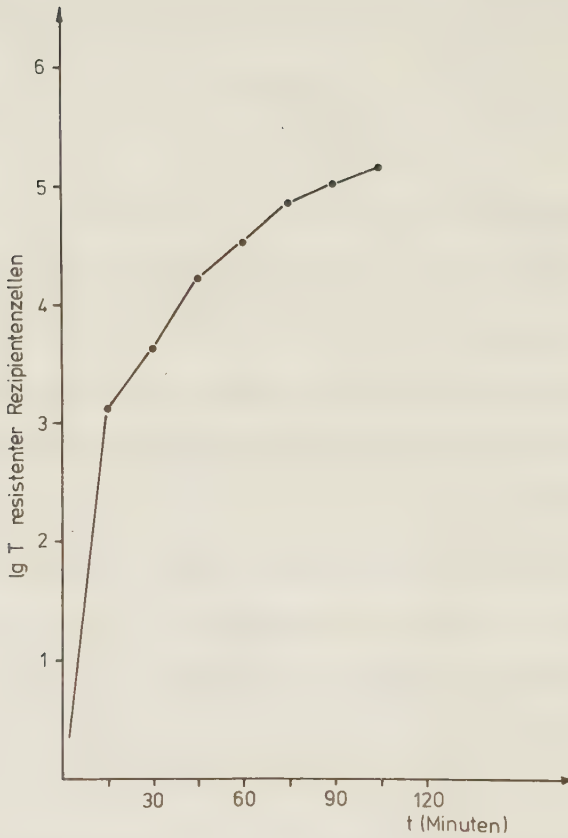


Abb. 27: R12644-1-Transfer im Flüssigmedium von NC22 (R12644-1) nach E. coli K12-1. Die Transferkinetik ist als lg T resistenter Rezipientenzellen in Abhängigkeit von der Konjugationszeit aufgetragen.

(●) Selektion für K12 (R12644-1) auf PA+Str+Amp

Bei der Kreuzung auf Festmedium wurde dies durch die hohe Transferfrequenz von 10^{-2} indiziert, bei der Kreuzung im Flüssigmedium zeigte sich ein sehr steiler Anstieg der Transferkinetik. Beide Ergebnisse beweisen eine effektive Mobilisierung der Resistenzgene von R12644-1.

3.4.5 Transformation von E. coli MB101 mit Plasmid-DNA aus NC22 (R12644-1)

Die notwendige Plasmid-DNA wurde aus dem Stamm NC22 (R12644-1) durch präparative CsCl-EthBr-Dichtegradientenzentrifugation gewonnen. Nach der Aufbereitung der DNA durch Entfernung des EthBr und Dialyse gegen TEN-Puffer wurde die DNA Konzentration bestimmt. Für die Transformation wurden 25 µg Plasmid-DNA eingesetzt. Vom Rezipientenstamm MB101 wurden ca. 10^8 Zellen verwendet. Die Selektion der transformierten, antibiotikaresistenten E. coli-Bakterien erfolgte auf PA + Amp-Agar.

Ergebnis: Pro µg Plasmid-DNA wurden ca. 100 amp-r Kolonien gebildet. Das Antibiotogramm dieser MB101 (R12644-1)-Stämme bestätigte die Übertragung des gesamten Resistenzspektrums, nämlich Resistenz gegen Amp, Carb und Ceph. Eine dieser isolierten Kolonien wurde auf Infektiosität des R12644-1 getestet.

Eine durch Transformation entstandene MB101-Kolonie mit dem nachgewiesenen Resistenzspektrum amp-r, carb-r und cerph-r diente als Donor bei einer Festmediumkreuzung.

Donor: MB101(R12644-1) nal-s, amp-r

Rezipient: NC22 nal-r, amp-s

Selektionsmedium: PA + Nal + Amp (Platten)

Ergebnis: Es waren keine amp-r NC22-Kolonien nachzuweisen, d. h. es fand kein Resistenztransfer von dem durch Plasmid-DNA-Transformation entstandenen MB101(R12644-1) nach NC22 statt. Durch die weiteren Experimente sollte die Plasmid-DNA dieses nichttransmissiblen R12644-1-Faktors charakterisiert werden.

3.4.6 Nachweis und Isolierung von Plasmid-DNA aus MB101(R12644-1)

Nach CsCl-EthBr-Dichtegradientenzentrifugation eines MB101(R12644-1)-Lysates konnte eine schwach fluoreszierende Plasmidbande identifiziert werden. Diese DNA wurde zur weiteren Analyse nach der in D.1.4 entwickelten Methode isoliert.

3.4.7 Darstellung und Längenmessung der Plasmide aus MB101(R12644-1)

Die Längenmessung der elektronenmikroskopisch dargestellten Plasmide (vgl. Abb. 28, S. 81) bewies einheitliche Plasmidgrößen in dieser Fraktion. Die Längenverteilung der Plasmide ist in Abb. 25B (S. 82) aufgezeichnet.

Die mittlere Plasmidlänge von $4.4 \pm 0.13 \mu\text{m}$ ergibt ein Molekulargewicht von 9×10^6 amu. Dieses Molekulargewicht entspricht dem der Plasmide der Längensklasse 4, die erstmals im Stamm NC22(R12644-1) gefunden wurden (vgl. Tab. 13, S. 80).

3.4.8 Dichtebestimmung der Plasmid-DNA aus MP101(F12644-1)

Die Zentrifugation dieser DNA im CsCl-Gradienten in der analytischen UZ zeigte erwartungsgemäß nur eine Bande. Die Dichte dieser DNA betrug 1.706 g/ml . das Zentrifugationsergebnis ist in Abb. 26B (S. 83) dargestellt.

3.4.9 Interpretation der Ergebnisse

Tabelle 14 (S. 92) zeigt eine Zusammenstellung der Plasmiddaten, die gemeinsam mit den Ergebnissen der genetischen Experimente zur Charakterisierung von R12644 und seinen Derivaten R12644-1 und R12644-2 führten. Außer der molekularbiologischen Charakterisierung der R-Faktorderivate konnte die in Abschnitt D.3.2.5 aufgestellte Hypothese bestätigt werden. Die dazu notwendigen Bedingungen, nämlich Zuordnung von Plasmidlänge, -dichte und -funktion für eines der an der Kointegration zur Plasmidklasse 3 (40.6 μm) beteiligten Plasmide, konnten erfüllt werden.

Für die Plasmide der Längensklasse 2 (9 - 10 μm) mit einer DNA-Dichte von 1.700 g/ml wurden lediglich RTF-Funktionen nachgewiesen. Durch die Abwesenheit dieser Moleküle im transformierten Stamm MB101(R12644-1) wurde nur noch eine nichttransmissible Resistenzdeterminante von 4.4 μm Länge gefunden. Den Plasmiden der Längensklasse 1 (31.5 μm) konnten die Eigenschaften von Multiresistenzdeterminanten zugeordnet werden, da diese Plasmide in beiden R12644-Derivaten fehlten. Die Plasmide mit der Länge 4.2 μm (aus NC22(R12644-1)) und 6.2 μm (aus NC22(R12644-2)) sind verkürzte r-Determinanten, die mit dem Resistenztransferfaktor (Plasmide der Längensklasse 2) kotransferiert werden.

Unter diesem Aspekt wird auch die Plasmidintegration:

$\text{RTF (9.1 } \mu\text{m} + \text{r (31.5 } \mu\text{m)} \rightleftharpoons \text{RTF-r (40.6 } \mu\text{m)}$ verständlich.

Die damit einhergehende Dichteverschiebung zugunsten der 1,708 g/ml Bande stellte eine weitere Bestätigung des theoretischen Modells dar:

$$1/4-1,700/\text{ml-DNA} + 3/4-1,710\text{g/ml-DNA} = 4/4-1,7075\text{g/ml}$$

Die r-Determinanten des R12644-1- und R12644-2-Faktors unterscheiden sich sowohl in der Länge (4,2 : 6,2 μm), in der Dichte (1,706 : 1,712 g/ml), im Resistenzspektrum (amp-, carb-, cep~~h~~-r : str-, sss-, tet-r) als auch in ihrer Entstehung.

Stamm	Plasmid- klasse	Länge (μ m)	Molekular- gewicht amu $\times 10^6$	Dichte (σ /ml)	GC (%)	Funktion
UR12644	1	31.5	65	1.710	51	r-Determ. (11 Res.)
NC22 (R12644)	1	30.7	64	-	-	r-Determ. (11 Res.)
UR12644	2	9.1	19	1.700	41	RTF
NC22 (R12644)	2	10.0	21	1.700	41	RTF
UR12644-2	2	9.4	19.5	1.700	41	RTF
NC22 (R12644-2)	2	9.6	20	1.700	41	RTF
NC22 (R12644-1)	2	9.1	19	1.700	41	RTF
NC22 (R12644)	3	40.6	84	1.708	49	r-Determ. + RTF
NC22 (R12644-1)	4	4.2	9	1.706	47	r-Determ. (amp-r,
MB101 (R12644-1)	4	4.4	9	1.706	47	carb-r, cep-r)
NC22 (R12644-2)	5	6.2	13	1.712	53	r-Determ. (str-r,
UR12644	a	1.8	3.7	-	-	sss-r, tet-r)
UR12644-2	a	1.8	3.7	1.709	50	? ?
UR12644	b	2.8	5.8	-	-	? ?
UR12644-2	b	2.8	5.8	1.709	50	? ?

Tabelle 14: Zusammenstellung der Plasmiddaten und -eigenschaften des R12644, des R12644-1 und des R12644-2 aus verschiedenen E. coli Stämmen.

E: Diskussion

1. Methodik der Plasmidanalyse: Ein vereinfachtes Verfahren zur Plasmidisolierung.

Für die Plasmidanalyse des R323- und R12644-Faktors wurden die Standardbedingungen der CsCl-EthBr-Dichtegradientenzentrifugation zur Isolierung von ccc-DNA angewandt. Die Bandenidentifikation im Gradienten erfolgte aufgrund der

DNA-EthBr-Fluoreszenz im UV-Licht. Zur DNA-Isolierung wurde das Zentrifugenröhrchen seitlich mit einer Spritze angestochen und die Plasmidbande abgezogen. Dieses Verfahren stellt eine wesentliche Vereinfachung dar, da

1. keine radioaktive Markierung der DNA benötigt wird,
2. eine um den Faktor 10 größere Zellmenge verarbeitet werden kann, ohne daß Fraktionierungsartefakte auftreten.

Zur Weiterverwendung der Plasmidfraktionen für die elektronenmikroskopische Darstellung (16, 26), für Dichtemessungen (22,29) und DNA-Transformationsexperimente (14) war die nach der angegebenen Methode erzielte DNA-Konzentration ausreichend.

Die Lysis der Zellen nach dem Sarkosylverfahren (5) bildete einen wichtigen Bestandteil der Isolierung der Plasmid-DNA des R323- und R12644-Faktors. Die Zelllysis nach dem "cleared lysate"-Verfahren (23) führte zu einer selektiven Anreicherung von kleinen Plasmiden mit einer Länge von 1 - 3 μ m.

Die elektronenmikroskopische DNA-Darstellung zeigte einen Überschuß dieser Plasmide gegenüber nur vereinzelt auftretenden R-Faktormolekülen.

Der Grund dafür könnte in unterschiedlichen Replikationsmechanismen für große und kleine Plasmide aus UR323 und UR12644 liegen. Kleine Plasmide mit "relaxed replication" (35) sind im Gegensatz zu Plasmiden mit "stringent replication" (25) in hoher Kopienzahl und nicht membrangebunden in der Zelle vorhanden und lassen sich dadurch relativ einfach über ein "cleared lysate" -Verfahren isolieren (9). Da nach dieser Lysismethode die Ausbeute der großen Plasmide zu gering war, wurde für die weiteren Plasmidisolierungen das Sarkosyllsismethode verwendet, da dabei auch die großen Plasmide freigesetzt und isoliert werden konnten.

2. Der Resistenzfaktor R323 - ein stabil kointegriertes Plasmid

Der multiresistente E. coli-Stamm UR323 zeigt Resistenz gegen 11 Antibiotika. Der Anteil der Plasmid-DNA dieses Stammbeträgt 2% der Gesamt-DNA. Die Plasmidfraktion enthält unterschiedlich große Plasmide von 1.2 μm und 33.6 μm Länge. Der Transfer der 11 Resistenzen nach E. coli NC22 war mit der Übertragung der Plasmide der Längenklasse 1 (32,2 μm) verbunden. Der Resistenzfaktor R323 ist demnach ein kointegriertes Plasmid (13, 2) bei dem der Resistenztransferfaktor (PTF) kovalent mit der Multiresistenzdeterminante (r) für insgesamt 11 Drogenresistenzen gekoppelt ist. Diese Ergebnisse sind in der Modellskizze der Abb. 29 zusammengefaßt: die entsprechenden Plasmiddaten enthält die darunterliegende Tabelle.

Zu diskutieren bleibt noch die genetische Determinante für die H_2S -Produktion des Stammes UP323.

Da in der Literatur mehrere Hinweise für extrachromosomal kodierte H_2S -Produktion existieren (32, 47), könnten die kleinen, nichttransferierbaren Plasmide der Längsenklasse 2 ($1.2 \mu m$) mit dieser Fähigkeit zur Reduktion von Schwefelverbindungen in Zusammenhang gebracht werden. Die vorliegenden Experimente lieferten jedoch noch keinen Beweis für diese Vermutung.

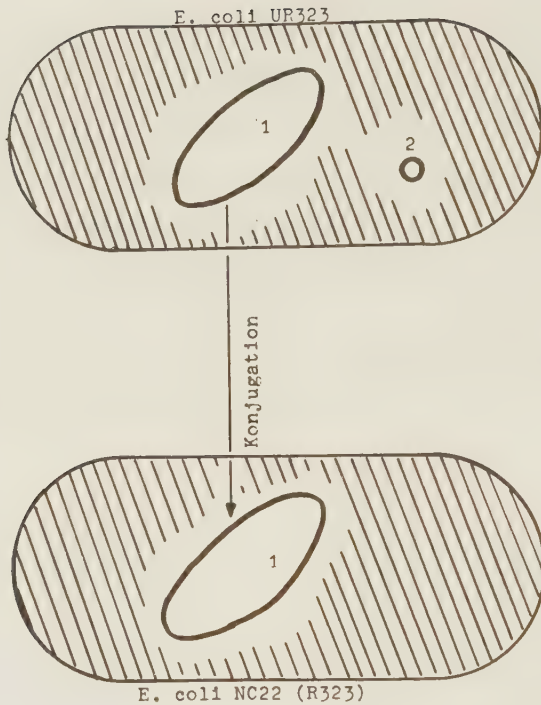


Abb. 29: Der Resistenzfaktor R323, ein kointegriertes Plasmid. (Die Zahlen 1 und 2 geben die Längenklassen der entsprechenden Plasmide an.)

Stamm	Plasmid- klasse	Länge(µm) +Stand.abw.	Molek.gew. (amu)x10 ⁶	Dichte (g/ml)	GC (%)	Funktion
UR323	1	33.6 <u>+1.8</u>	70	1.710	51	RTF+r(11R)
	2	1.21 <u>+0.07</u>	2.5	-	-	?
NC22 (R323)	1	32.2 <u>+2.0</u>	67	1.710	51	RTF+r(11R)

3. Der Resistenzfaktor R12644 - ein instabil kointegriertes Plasmid

Der *E. coli* Stamm UR12644 zeigt das gleiche Resistenzspektrum wie UR323. UP12644 enthält aber Plasmide, die 4 verschiedenen Größenklassen (a, b, 1, 2) angehören. Der Plasmidanteil beträgt ca. 3% der Gesamt-DNA. Der Transfer der 11 Antibiotikaresistenzen von UR12644 nach *E. coli* NC22 war mit der Übertragung eines 40.6 μm langen Plasmids (Längenklasse 3) verbunden. Gleichzeitig konnten im Rezipientenstamm auch Plasmide der Längenklassen 1 (30.7 μm) und 2 (10.0 μm) gefunden werden. Beide Plasmidgrößen wurden im Gegensatz zu den Plasmiden der Längenklasse 3 bereits im Ausgangsstamm nachgewiesen. Zur Erklärung dieses Befunds könnte man sich die Entstehung der 40.6 μm langen Plasmide durch Kointegration von Molekülen der Längenklassen 1 und 2 vorstellen (vgl. Abb. 30). Diese zum Transfer kointegrierten Plasmide, bestehend aus RTF und *r*-Determinante, können im Rezipienten wieder in die Ausgangsplasmide der Längenklassen 1 und 2 zerfallen. Dieses Modell konnte durch die Dichtebestimmung der Plasmidmoleküle unterstützt werden. Für die Plasmide der Längenklasse 1 wurde eine Dichte von 1.710 g/ml berechnet, während die Plasmid-DNA der Längenklasse 2 eine Dichte von 1.700 g/ml zeigte. Die theoretische Hybriddichte eines kointegrierten Plasmids, bestehend aus je einem Plasmid beider Längenklassen, würde ca. 1.7075 g/ml betragen. Die gemessene Dichte der 40.6 μm langen Plasmide lag bei 1.708 g/ml und zeigte damit gute Übereinstimmung mit dem theoretischen Wert.

Durch die Charakterisierung des F-Faktor-Derivats R12644-1 konnte gezeigt werden, daß den Plasmiden der Längensklasse 2 die Funktion eines Resistenztransferfaktors (RTF) zukommt. Den Plasmiden der Längensklasse 1 konnte die Eigenschaft einer Multiresistenzdeterminante zugeordnet werden. Die Korrelation der DNA-Dichten mit den entsprechenden Plasmidklassen erfolgte ebenfalls über die Charakterisierung der Derivate R12644-1 und R12644-2.

Die Funktion der Plasmide der Längensklassen a und b (1.8 μ m und 2.8 μ m), die bei den bisherigen Transferexperimenten nicht mit Übertragen wurden, ist noch unbekannt. Diese Moleküle könnten aber wiederum mit der Fähigkeit zur H_2S -Produktion in Zusammenhang gebracht werden.

Das Modell zur Charakterisierung von R12644 ist in Abb. 30 graphisch dargestellt. Die entsprechenden Plasmiddaten sind der Tabelle unterhalb der Abbildung zu entnehmen. R12644 ist aufgrund seiner Plasmideigenschaften als ein instabil kointegriertes Plasmid zu bezeichnen (13). Bisher wurden Resistenzplasmide mit vergleichbaren Eigenschaften nur in Proteus gefunden. In E. coli bildeten diese Plasmide jeweils stabile Kointegrate (13, 36).

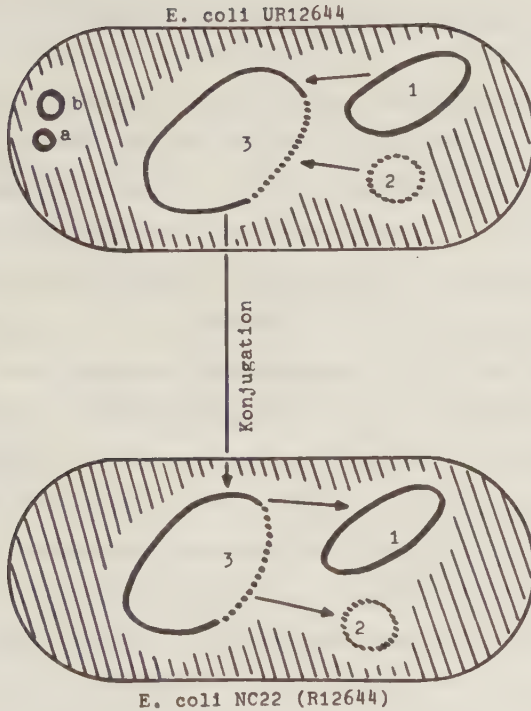


Abb. 30: Der Resistenzfaktor R12644, ein instabil kointegrier-
tes Plasmid. (Die Bezeichnungen 1, 2, 3, a und b geben
die Längenklassen der entsprechenden Plasmide an.)

Stamm	Plasm.- klasse	Länge (µm) +Stand.abw.	Molek.gew. (amu)x10 ⁶	Dichte (ρ/ml)	GC (%)	Funktion
UR12644	1	31.5+1.0	65	1.710	51	r(11Res.)
	2	9.1+0.6	19	1.700	41	RTF
	3	—	—	1.708	49	RTF+r(11)
	a	1.8+0.08	3.7	1.709	50	?
	b	2.8+0.16	5.8	1.709	50	?
NC22 (R12644)	1	30.7	64	—	—	r(11Res.)
	2	10.0+0.25	21	1.700	41	RTF
	3	40.6+1.3	84	1.708	49	RTF+r(11)

4. R12644-2: Nachweis einer verkürzten Resistenzdeterminante

Durch ein Experiment zur Elimination von Resistenzgenen konnte von R12644 ein Abkömmling isoliert werden, der einen Verlust von 8 Resistenzen zeigte. Die verbleibenden 3 Resistenzen (str-r, sss-r, tet-r) des entstandenen Derivats R12644-2 konnten nur mit einer geringen Transferfrequenz (10^{-7}) nach E. coli NC22 übertragen werden. zeigt im Vergleich zum R12644-Transfer eine Reduktion der Infektiosität auf 1/1000 an. Mit dem Resistenztransfer erfolgte die Übertragung von 2 unterschiedlich großen Plasmiden auf den Rezipienten. Aus NC22(R12644-2) konnten Plasmide der Längensklasse 2 (9.6 μm) und Plasmide einer neuen Längensklasse 5 (6.2 μm) isoliert werden. In dem durch Plasmidelimination entstandenen Ausgangsstamm (UR12644-2) konnten neben den Plasmiden der Längensklasse 2 (9.4 μm) nur noch die kleinen DNA-Ringe der Längensklassen a und b (1.8 μm und 2.8 μm) gefunden werden. Für die Entstehung von R12644-2 wurde deshalb angenommen, daß nach einer spontanen Aufspaltung der Multiresistenzdeterminante (Plasmide der Längensklasse 1) der Großteil der Resistenzen, nämlich 8, eliminiert wurde. Drei benachbarte Resistenzgene konnten der Eliminierungsprozedur durch Integration ins Chromosom entgehen. Durch niederfrequente Desintegration konnte dieses Plasmid (6.2 μm) mit dem vorhandenen RTF (9.4 μm) kotransferiert werden.

Dieses Modell (vgl. Abb. 31) wurde durch ein DNA-Transformationsexperiment bestätigt, da die aus UP12644-2 isolierte Plasmidfraktion keine transformierende Aktivität bei *E. coli* MB101 zeigte. Die charakteristischen Plasmidaten sind der Legende zu Abb. 31 zu entnehmen. Die Plasmide der Längenkategorie 2 zeigen die für sie typische Dichte von 1.700 g/ml, während die Plasmide der Längenkategorie 5 mit 1.712 g/ml eine geringfügig höhere DNA-Dichte gegenüber der vollständigen r-Determinante ($\rho = 1.710$ g/ml) zeigen. Diese höhere DNA-Dichte könnte durch die Abspaltung der Plasmide aus einer GC-reichen Region der ursprünglichen Multiresistenzdeterminante erklärt werden. Das molekulare System der infektiösen R12644-2-Resistenz ist ein Plasmid-Aggregat (13), da im Gegensatz zu R12644 keine kovalente Kopplung zwischen RTF und r-Determinante gefunden wurde.

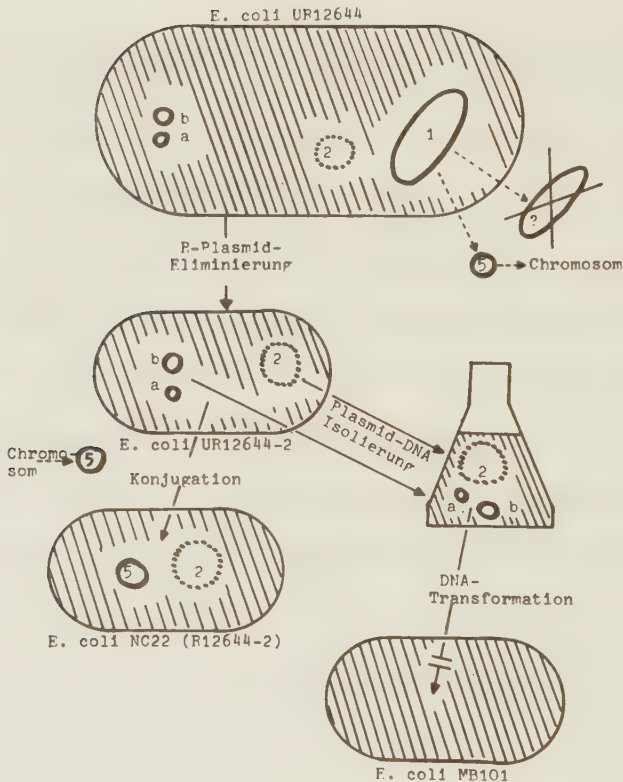


Abb.31: Entstehung und Identifizierung von R12644-2, einem Plasmidaggregat. (Die Bezeichnungen 1, 2, 5, a und b geben die Längenklassen der entsprechenden Plasmide an.)

Stamm	Plas.- klasse	Länge (µm) +Stand.abw.	Molek.gew. (amu)x10 ⁶	Dichte (g/ml)	GC (%)	Funktion
UR12644	1.	31.5+1.0	65	1.710	51	r(11Res)
	2	9.1+0.6	19	1.700	41	RTF
	a	1.8+0.08	3.7	1.709	50	?
	b	2.8+0.16	5.8	1.709	50	?
UR12644-2	2	9.4+0.5	19.5	1.700	41	RTF
	a	1.8+0.18	3.7	1.709	50	?
	b	2.8+0.22	5.8	1.709	50	?
NC22 (R12644-2)	2	9.6+0.32	20	1.700	41	RTF
	5	6.2+0.35	13	1.712	53	r(3Res.)

5. R12644-1: Nachweis eines Plasmid-Aggregats mit einer isoliert auftretenden Resistenztransfereinheit.

Bei der Übertragung von R12644 von E. coli UR12644 nach E. coli NC22 entstanden in geringerer Häufigkeit auch Rezipientenkolonien, die nicht mehr das gesamte Resistenzspektrum von R12644 ausprägten. Diese NC22(R12644-1)-Zellen zeigten nur noch Resistenz gegen Amp, Carb und Ceph. R12644-1 konnte mit relativ hoher Frequenz (10^{-2}) von NC22 nach E. coli K12-1 transferiert werden.

Durch die Plasmidanalyse eines NC22(R12644-1)-Stammes konnten 2 unterschiedlich große Plasmide nachgewiesen werden.

Die Plasmide mit 9.1 μ m Länge konnten der Längensklasse 2 zugeordnet werden, die Plasmide mit der Länge von 4.2 μ m gehörten zu der neuen Längensklasse 4. Durch DNA-Transformation von E. coli MB101 mit Plasmid DNA aus NC22(R12644-1) konnte eine Separation der Resistenzdeterminante erreicht werden. In MB101(R12644-1) waren nur noch Plasmide der Längensklasse 4 vorhanden. Die Resistenzen(amp-r, carb-r, ceph-r) dieses Stammes erwiesen sich als nichttransmissibel.

Damit waren die in diesem Stamm nicht anwesenden Plasmide der Längensklasse 2 als Resistenztransferfaktoren identifiziert. Ihr Molekulargewicht beträgt 19×10^6 amu, die DNA Dichte beträgt in CsCl 1.700 g/ml. Die Entstehung der Plasmide der Längensklasse 4 mit der Dichte von 1.706 g/ml kann durch Abspaltung aus einer GC-reichen Region der Multi-resistenzdeterminante erklärt werden. Die Längenverteilung der Plasmide aus UR12644 (siehe Abb. 15, S.54) gibt einen

Hinweis für eine entsprechende Aufspaltung, da in diesem Stamm sowohl Plasmide mit ca. 4 μ m als auch Plasmide mit 26 μ m gefunden wurden. Die Mobilisierung eines 26 μ m langen Plasmids mit den 8 zu R12644-1 komplementären Resistenzen konnte bisher nicht nachgewiesen werden.

Die transmissible Form von R12644-1 stellt ebenso wie die von R12644-2 ein Plasmid-Aggregat dar, wobei die Resistenz-determinanten jeweils von dem isoliert vorliegenden FTF mobilisiert werden. Ein graphisches Modell zur Entstehung und Charakterisierung von R12644-1 wird in Abb.32 gezeigt.

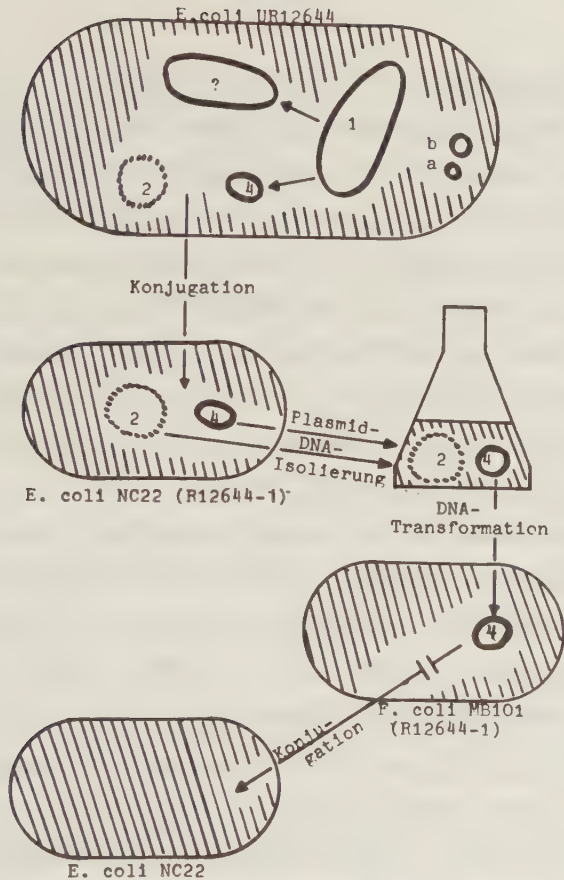


Abb. 32: Entstehung und Identifizierung von R12644-1, einem Plasmidaggregat. (Die Bezeichnungen 1, 2, 4, a und b geben die Längsklassen der entsprechenden Plasmide an.)

Stamm	Plas.- klasse	Länge (μm) +Stand.abw.	Molek.gew. (amu) $\times 10^6$	Dichte (g/ml)	GC (%)	Funktion
UR12644	1	31.5 ± 1.0	65	1.710	51	r(11Res.)
	2	9.1 ± 0.6	19	1.700	41	PTF
	4	—	—	—	—	r(3Res.)?
	a	1.8 ± 0.08	3.7	1.709	50	?
	b	2.8 ± 0.16	5.8	1.709	50	?
NC22 (R12644-1)	2	9.1 ± 0.36	19	1.700	41	RTF
	4	4.2 ± 0.35	9	1.706	47	r(3Res.)?
MB101 (R12644-1)	4	4.4 ± 0.13	9	1.706	47	r(3Res.)

6. Die Verwandtschaft von R323 und R12644

Die *E. coli*-Stämme UR323 und UR12644 zeigen trotz unabhängiger Isolierung (43) eine große Ähnlichkeit. Die Charakterisierung dieser Stämme durch Traub (1975) erbrachte neben dem übereinstimmenden Resistenzspektrum bei beiden Stämmen auch den Nachweis von H_2S - und Hämolyysinproduktion. Der einzige Unterschied zwischen UR323 und UR12644, die beide auch ein identisches Fermentationspektrum von 16 getesteten Zuckern zeigten, besteht in der Dulcitolfermentation von UR323.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß trotz gleicher Resistenzen die molekulare Gestalt der R-Faktoren aus UR323 und UR12644 unterschiedlich ist. R323 ist ein stabil kointegriertes Plasmid von $33.6 \pm 1.8 \mu m$ Länge, während R12644 instabil kointegriert und aus einem RTF von $9.1 \pm 0.6 \mu m$ und einer Multiresistenzdeterminante von $31.5 \pm 1.0 \mu m$ besteht. Außerdem konnten von R12644 Derivate isoliert werden, die eine verkürzte r-Determinante besitzen, und die zusammen mit dem isoliert vorliegenden RTF ein Plasmid-Aggregat bilden.

Vergleicht man jedoch den R323-Faktor mit der Multiresistenzdeterminante von R12644, so kann unter Einbeziehung der Standardabweichungen eine sehr ähnliche Plasmidgröße festgestellt werden. Die Dichtebestimmungen ergaben sogar völlige Übereinstimmung mit $\rho = 1.710 \text{ g/ml}$ für R323 und die r-Determinante von R12644. Es wäre deshalb möglich, daß sich

beide R-Faktoren nur durch den PTF des R12644 unterscheiden. Das würde bedeuten, daß beide P-Faktoren möglicherweise den gleichen Ursprung hatten, und daß das als Multiresistenzdeterminante des R12644 identifizierte Plasmid mit R323 identisch ist. Erst durch den zusätzlichen, "fremden" PTF, der die Transferkontrolle des ursprünglich selbstständigen R-Faktors übernommen hat, ist das bestehende R12644-System entstanden. Dieser RTF zeichnet sich neben seinen außergewöhnlichen Fähigkeiten auch durch seine ungewöhnlichen molekularen Daten aus. Seine DNA-Dichte von 1.700 g/ml kann ein Hinweis für die separate Entstehung dieses Plasmids sein. Diese Plasmiddichte wurde bisher bei E. coli nur selten gefunden (10). Ein weiteres interessantes Merkmal diese RTF ist sein geringes Molekulargewicht von 19×10^6 amu, wie der folgende Vergleich mit einigen anderen Transferfaktoren zeigt.

Transferfaktor	Literatur	Molekulargewicht (amu) $\times 10^6$
RTF aus UR12644	-	19
RTF1	(17)	42
Δ -Faktor	(30)	60
F-Faktor	(13)	64

Zur Überprüfung der in diesem Abschnitt aufgestellten Hypothese zur Verwandtschaft von R323 und R12644 könnte die physikalische Kartierung der Plasmid-DNA dienen. Durch partielle DNA-Denaturierung könnten die AT-reichen Regionen

der Plasmide kartiert werden. Eine Übereinstimmung im Vergleich der Denaturierungsmuster würde eine Verwandtschaft der entsprechenden Plasmide anzeigen.

F. Literature

- (1) Anderson, E. S., and M. J. Lewis: Characterization of a transfer factor associated with drug resistance in *Salmonella typhimurium*
Nature (London) 208, 843-849 (1965)
- (2) Anderson, E. S., and E. Natkin: Transduction of resistance determinants and R factors of the transfer systems by phage P1kc
Mol. Gen. Genet. 114, 261-265 (1972)
- (3) Bauer, A. W., Kirby, W.M.M., Sherris, J.C., and Turck, M.: Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method.
Amor. J. Clin. Pathol. 45, 493-496 (1966)
- (4) Bauer, W., and J. Vinograd: The interaction of closed circular DNA with intercalative dyes. I. The superhelix density of SV40 DNA in the presence and absence of dye.
J. Mol. Biol. 33, 141-171 (1968)
- (5) Bazaral, M., and D.R. Helinski: Circular DNA Forms of Colicinogenic Factors E1, E2 and E3 from *Escherichia coli*
J. Mol. Biol. 36, 185-194 (1968)
- (6) Bouanchaud, D.H., Scavizzi, M.R. a. Chabbert, Y.A.: Elimination by ethidium bromide of antibiotic resistance in *Enterobacteria* and *Staphylococci*
J. Gen. Microbiol. 54, 417-425 (1969)

- (7) Bollum, F.J., : Filter paper disk techniques for assaying radioactive macromolecules, p.296. In: G.L. Cantoni and D.R. Davies (ed.), Procedures in nucleic acid research. Harper & Row, New York (1967)
- (8) Boyce, R.P. and R.B. Setlow, : A simple method of increasing the incorporation of thymidine into the deoxyribonucleic acid of *Escherichia coli*
Biochim. Biophys. Acta 61, 618-620 (1962)
- (9) Göbel, W.: persönliche Mitteilung
- (10) Christiansen, C., G. Christiansen, A. Leth Bac, and A. Stenderup: Extrachromosomal Deoxyribonucleic Acid in different Enterobacteria
J. Bact. 114, 367-377 (1973)
- (11) Clowes, R. C. : Transfert génétique des facteurs colicinogènes. (Symp. on Bacteriocinogy, Paris, May, 1965)
Ann. Inst. Pasteur 107: suppl. no. 5, 74-92 (1964)
- (12) Clowes, R. C., E.E.M. Moody, and R.H. Pritchard:
Elimination of extrachromosomal elements in thymineless strains of *Escherichia coli* K12
Genet. Res. 6, 147-152 (1965)
- (13) Clowes, R. C. : Molecular structure of bacterial plasmids
Bacteriol. Rev. 36, 361-405 (1972)

- (14) Cohen, S. N., A. C. Y. Chang, and L. Hsu: Non-chromosomal Antibiotic Resistance in Bacteria: Genetic Transformation of *Escherichia coli* by R-Faktor DNA
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 69, 2110-2114 (1972)
- (15) Cohen, S. N., A. C. Y. Chang, H. W. Boyer, R.B. Helling: Construction of Biologically Functional Bacteriophage Plasmids In Vitro
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 70, 3240-3244 (1973)
- (16) Davis, R. W., N. Simon, U. Davidson: Electron-microscope Heteroduplex Methods for mapping regions of Base sequence Homologies of Nucleic Acids.
Methods in Enzymology 21, 413-428 (1971)
Acad. Press New York/London
- (17) Embden, J., S.N., Cohen: Molecular and Genetic Studies of an R. Factor System Consisting of Independent Transfer and Drug Resistance Plasmids
J. Bact. 116, 699-709 (1973)
- (18) Grinstead, J., J. R. Saunders, L. C. Ingram, R. B. Sykes, and M. H. Richmond: Properties of an R Factor Which Originated in *Pseudomonas aeruginosa* 1822
J. Bact. 110, 529-537 (1972)
- (19) Heumann, W. : Conjugation in starforming *Rhizobium lupini*
Molec. gen. Genet. 102, 132-144 (1968)

- (20) Hirota, Y., T. Iijima, : Acriflavine as an effective agent for eliminating R-factor in *Escherichia coli* K12
Nature 180, 655-656 (1957)
- (21) Hudson, B., D. A. Clayton, and J. Vinograd: Complex mitochondrial DNA
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 33, 435-442 (1968)
- (22) Ifft, J. B., D.H. Voet and J. Vinograd, : The determination of density distribution and density gradients in binary solution at equilibrium in the ultracentrifuge. *J. Phys. Chem.* 65, 1138 (1961)
- (23) Ingram, L., R.B. Sykes, J. Grinstead, J. R. Saunders and M.H. Richmond: A Transmissible Resistance Element from a Strain of *Pseudomonas aeruginosa* containing no detectable Extrachromosomal DNA.
J. Gen. Microbiol. 72, 269-279 (1972)
- (24) Jacob, A. E., N. J. Grinter: Plasmid RP4 as a vector replicon in genetic engineering
Nature 255, 505-506 (1975)
- (25) Kontomichalou, P. M. Mitani, and R. C. Clowes: Circular R-factor molecules controlling penicillinase synthesis, replicating in *Escherichia coli* under either relaxed or stringent control.
J. Bact. 104, 34-44 (1970)
- (26) Lang, D., and M. Mitani: Simplified quantitative electron microscopy of biopolymers
Biopolymers 9, 373-379 (1970)

- (27) Lang, D. : Molecular weights of coliphages and coliphage DNA. III. Contour length and molecular weight of DNA from bacteriophages T4, T5, and T7, and from bovine papilloma virus
J. Mol. Biol. 54, 557-565 (1970)
- (28) Mandel. M., A. Higa: Calcium-dependent Bacteriophage DNA Infection
J. Mol. Biol. 53, 159-162 (1970)
- (29) Meselson, M., F. W. Stahl, J. Vinograd: Equilibrium sedimentation of macromolecules in density gradients
Proc. Nat. Acad. Sci 43, 581-588 (1957)
- (30) Milliken, C. E. and R. C. Clowes: Molecular structure of an R factor, its component drug resistance determinants and transfer factor
J. Bact. 113, 1026-1033 (1973)
- (31) Nisioka, T., M. Mitani, and R. C. Clowes: Composite circular forms of R-factor deoxyribonucleic acid molecules
J. Bact. 97, 376-385 (1969)
- (32) Ørskov, I., F. Ørskov: Plasmid-determined H₂S Character in Escherichia coli and its Relation to Plasmid-carried Raffinose Fermentation and Tetracycline Resistance Characters
J. Gen. Microbiol. 77, 487-499 (1973)

- (33) Radloff, R., W. Bauer and J. Vinograd, : A dye-buoyant - density method for the detection and isolation of closed circular duplex DNA. The closed circular DNA in Hela cells
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 57, 1514-1520 (1967)
- (34) Robinson, R. A., R.H. Stokes: Electrolyte solutions
Acad. Press, New-York (1955)
- (35) Rownd, R. : Replication of a bacterial episome under relaxed control
J. Mol. Biol. 44, 387-402 (1969)
- (36) Rownd, R., and S. Mickel: Dissociation and reassociation of RTF and r-determinants of the R-factor NR1 in *Proteus mirabilis*
Nature N. Biol. 234, 40-43 (1971)
- (37) Saunders, J., and J. Grinstead: Properties of RP4 an R Factor which originated in *Pseudomonas aeruginosa* S8
J. Bact. 112, 2, 690-696 (1972)
- (38) Schildkraut, C. L., J. Marmur, and P. Doty: Determination of base composition of deoxyribonucleic acid from its buoyant density in CsCl
J. Mol. Biol. 4, 430-443 (1962)
- (39) Studier, F. W., : Sedimentation studies of the size and shape of DNA
J. Mol. Biol. 11, 373-383 (1965)

- (40) Tomoeda, M., Inzuka, M., Kubo, N. and Nakamura, S. :
Effective elimination of drug resistance and
sex factors in *Escherichia coli* by sodium
dodecyl sulphate.
J. Bact. 95, 1078-1089 (1968)
- (41) Traub, W. H., E. A. Raymond: Modified motility-indole-
ornithine- H_2S medium (MIOH) for the routine
identification of rapid lactose-fermenting *Enterobacteriaceae*
Zbl. Bakt. Hyg. Parasitenk., I. Abt. Orig. 215,
401-403 (1970)
- (42) Traub, W. H., I. Kleber: Isolation of two strains of
Klebsiella pneumoniae with transferable resistance
determinants against ten antimicrobial drugs from
clinical material.
Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. A 229, 80-88 (1974)
- (43) Traub, W.H., I. Kleber: Characterization of two
 H_2S -producing, multiple-drugresistant isolates
of *Escherichia coli* from clinical urine specimens
Pathol. Microbiol., (im Druck)
- (44) Watanabe, T. and Fukasawa, T. : Episome mediated
transfer of drug resistance in *Enterobacteriaceae*.
II. Elimination of resistance factors by acridine
dyes
J. Bact. 81, 679-683 (1961)
- (45) Watanabe, W. : Infectious Drug Resistance
Scientific American 217, 19-27 (1967)

- (46) Watson, R., W. Bauer and J. Vinograd: An optical system for the photography of fluorescent bands in preparative ultracentrifuge tubes
Analyt. Biochem. 44, 200-204 (1971)
- (47) Layne, P., A.S.L. Hu, A. Balows, and B.R. Davis:
Extrachromosomal nature of hydrogen-sulfide production in *Escherichia coli*.
J. Bact. 106, 1029 - 1030 (1971)

Ich danke Herrn Prof. Dr. W. Heumann für seine Unterstützung und sein Interesse an dieser Arbeit. Herrn Dr. A. Pühler und Herrn Dr. W. H. Traub danke ich für die Überlassung der E. coli-Stämme UR323 und UF12644, für die Ermöglichung der Arbeiten in ihren Labors sowie für anregende Diskussionen. Bei Dr. Hans Burkardt bedanke ich mich für die Unterstützung meiner Arbeiten am Elektronenmikroskop.

Lebenslauf

Name: Friedrich Schöffl

Geburtstag: 9. 11. 1947

Geburtsort: Ebermannstadt

Eltern: Ernst Schöffl, Sattler- und Tapeziermeister
und Marie Schöffl, geb. Bauer

Schulen: 1954 - 1960 Volksschule in Pottenstein
1960 - 1964 Mittelschule in Ebermannstadt
22. 7. 1964 Abschlußzeugnis der staatlichen
Mittelschule in Ebermannstadt
1964 - 1967 Mathematisch-naturwissenschaft-
liches Gymnasium in Pegnitz
21. 7. 1967 Reifezeugnis des mathematisch-
naturwissenschaftlichen
Gymnasiums in Pegnitz

Studium: Nov. 57 - Dez. 73 Studium der Biologie an
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg
5. 11. 1970 Diplom-Biologen-Vorprüfung
14.12. 1973 Diplom-Biologen-Hauptprüfung
Diplomarbeit: Die zwei Transferregionen der
Rhizobium lupini Konjugation: Ein instabiler
Donor mit erhöhter Fertilität

Tätigkeit: Okt. 73 - Sept. 75 Wissenschaftlicher Mit-
arbeiter am Institut für Mikrobiologie in
Erlangen

(Friedrich Schöffl)

